

**Untersuchungen zur Rolle von Cyclin E1 in der
Zellzykluskontrolle muriner Hepatozyten**

**Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines**

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

**genehmigte Dissertation
von**

Dipl.-Biol. Nils-Holger Zschemisch

geboren am 26. August 1969, in Stadthagen

2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. B. Otto

Tag der Promotion: 3. August 2004

keywords: hepatocytes, Cyclin E1, knockout

Schlagworte: Hepatozyten, Cyclin E1, Knockout

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Kurzzusammenfassung	1
2 Abstract	2
3 Einleitung	
3.1 Cycline in der Zellzykluskontrolle	3
3.1.1 Der eukaryontische Zellzyklus	3
3.1.2 Cycline steuern die Zellzyklusprogression	3
3.1.3 Die Gene der Cyclin E-Familie in Mensch und Maus	5
3.1.4 Regulation der Expression und proteolytischen Degradation von Cyclin E	6
3.1.5 Cyclin E1 als Koordinator des G1-S-Übergangs	8
3.1.6 Regulation von Cyclin E1 durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikation	9
3.1.7 Cyclin E1 und Cyclin E2 in der Tumorigenese	11
3.1.8 Cyclin E1 in der Leberregeneration	12
3.1.9 Kompensation und Redundanz: Inaktivierung von Cyclin E1, Cyclin E1 und cdk2 in der Maus	12
3.2 “Gene Targeting“: Strategien zur genetischen Manipulation muriner Embryonen	13
3.3 Ziele der Arbeit	16
4 Materialien und Methoden	
4.1 Geräte	17
4.2 Mausstämme und transgene Mauslinien	19
4.3 Tierzucht und Isolation von Lebertumoren aus transgenen Mäusen	19
4.4 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	20
4.4.1 Verwendete Bakterienstämme	20
4.4.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	20
4.4.3 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	21
4.4.4 Verwendete Plasmide	22

4.5	Verwendete Oligonukleotide	23
4.6	Allgemeine Arbeitsmethoden zur Untersuchung von Nukleinsäuren	26
4.6.1	Isolierung genomischer DNA aus Geweben	26
4.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	27
4.6.3	Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen	28
4.6.4	Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren	28
4.6.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
4.6.6	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	29
4.6.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
4.6.8	Ligation von DNA	30
4.6.9	Agarosegelelektrophorese	30
4.7	Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen	31
4.7.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
4.7.2	Reverse Transkription (RT) und RT-PCR	34
4.7.3	Southern Blot	35
4.7.4	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ^{32}P	36
4.7.5	Hybridisierung mit radioaktiven Sonden	36
4.7.6	Sequenzierung von DNA	37
4.8	Arbeitsmethoden zur Charakterisierung von Proteinen	38
4.8.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen	38
4.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford	39
4.8.3	SDS-PAGE-Gelelektrophorese	40
4.8.4	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	41
4.8.5	Verwendete Antikörper	41
4.8.6	Westernblot	41
4.8.7	Immunopräzipitation	42
4.8.8	Histone H1-Kinase-Assay	43
4.9	Zellbiologische Methoden	43
4.9.1	Verwendete Zelllinien	43
4.9.2	Allgemeine Zellkulturverfahren	44
4.9.3	Methoden zur Transfektion somatischer Zellen	45

4.9.4	β-Galaktosidase-Assay	46
4.9.5	Etablierung stabil-transfizierter Zelllinien	47
4.10	Bestimmung des zellulären DNA-Gehaltes durch FACS-Analyse	48
4.10.1	Ernte und Fixierung von Zellen	48
4.10.1	Propidiumiodid-Färbung	48
4.10.2	FACS-Analyse	48
4.11	Manipulation embryonaler Stammzellen von <i>Mus musculus</i>	49
4.11.1	Kultivierung von embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	50
4.11.2	Kultivierung von muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)	52
4.11.3	Herstellung von Feederlayern	53
4.11.4	Transfektion von ES-Zellen durch Elektroporation	53
4.11.5	Selektion und Isolation von ES-Zellklonen	55
4.11.6	Präparation von ES-Zell-DNA	56
4.11.7	Identifizierung rekombinater ES-Zellklone	56
4.11.8	Herstellung chimärer Mäuse	56
5	Ergebnisse	
5.1	Untersuchungen zur Rolle von Spleißvarianten des murinen Cyclin E1-Gens in der Zellzyklusregulation	58
5.1.1	Expressionsmuster von Cyclin E1 in hepatozellulären Karzinomen der Maus	58
5.1.1.1	Isolierung der hepatozellulären Karzinome (HCC) nach transgener Expression von Onkogene c-myc und EGF	58
5.1.1.2	Identifizierung von Cyclin E1-cDNA-Isoformen in murinen HCCs	59
5.1.2	Analysen zur Expression von Cyclin E1-Varianten in murinen Hepatozyten in G0 und nach partieller Hepatektomie	62
5.1.3	Untersuchungen zur Transkription und Translation von Cyclin E1-Isoformen <i>in vitro</i>	64
5.1.4	Analysen zur Proteinfunktion der Cyclin E1-Isoformen <i>in vitro</i>	66
5.1.5	Untersuchungen zum Einfluß der Cyclin E1-Variante Δ3/8-Variante auf die G0-G1-Transition <i>in vitro</i>	68

5.1.5.1	Etablierung stabiler Zelllinien zur Expression von Wildtyp-Cyclin E1 und $\Delta 3/8$	68
5.1.5.2	Vergleichende FACS-Analyse zum Einfluß von $\Delta 3/8$ auf den Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus nach G1-Arrest	69
5.2	Etablierung eines Tiermodells zum konditionalen Knockout des Cyclin E1-Gens in der Maus	76
5.2.1	Erste Konzeption eines konditionalen Cyclin E1-Knockouts	76
5.2.1.1	Herstellung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors	76
5.2.1.2	Elektroporation, Selektion und Identifizierung des rekombinanten Cyclin E1-Allels in Bruce4-Zellen	80
5.2.1.3	Deletionen durch Expression der Cre-Rekombinase <i>in vitro</i>	80
5.2.2	Modifikation von pEasyFlox durch FRT-Erkennungssequenzen	81
5.2.2.1	Herstellung des 2 loxP-2 FRT-Basisvektors: pNeoFlirt	82
5.2.2.2	Funktionelle Evaluierung von pNeoFlirt	82
5.2.3	Klonierung und Sequenzierung des murinen Cyclin E1 3'-Abschnitts	86
5.2.4	Zweites Konzeption eines konditionalen Cyclin E1-Knockouts	90
5.2.4.1	Herstellung des 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors	90
5.2.4.2	Elektroporation, Selektion und Identifizierung des rekombinanten Cyclin E1-Allels in E14TG2a-Zellen	92
5.2.4.3	Erzeugung chimärer Mäuse	92
6	Diskussion	
6.1	Einfluß von Cyclin E1-Spleißvarianten auf die Regulation des Zellzyklus von Hepatozyten	93
6.1.1	Rolle von Cyclin E1 in der Hepatokarzinogenese	93
6.1.1.1	Induktion der Cyclin E1-Expression in transgenen HCCs	93
6.1.1.2	Einfluß der Isoformen IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ der Cyclin E1-mRNA auf die Tumorprogression	94
6.1.2	Charakterisierung des G0-Zustandes von Hepatozyten durch die $\Delta 3/8$ -Variante von Cyclin E1	96

6.2	Generierung einer konditionalen Cyclin E1-Knockout-Maus	98
6.2.1	Kritische Betrachtungen des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Konzepts	99
6.2.2	Optimierung der Cyclin E1-Gene-Targeting-Strategie	101
6.3	Ausblick	103
7	Abkürzungsverzeichnis	105
8	Literaturverzeichnis	107
9	Anhänge	126

Lebenslauf

Liste wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Eidesstattliche Versicherung

Danksagung

1 Kurzzusammenfassung

Cyclin E1 steuert die G1-S-Transition des eukaryontischen Zellzyklus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Cyclin E1 für die Zellzykluskontrolle in Hepatozyten der Maus untersucht. Dazu wurden zwei experimentelle Ansätze bearbeitet:

Zum einen wurde in dieser Arbeit eine konditionale Cyclin E1-Knockout-Maus generiert. Dazu wurde in murinen ES-Zellen durch homologe Rekombination *in vitro* ein rekombinantes Cyclin E1-Allel erzeugt, in dem die Exons 7-9, die für die essentielle Cyclin-Box kodieren, zur gerichteten Deletion mit loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase flankiert wurden. Durch Blastozysteninjektion rekombinanter ES-Zellen der Linien 3B7 und 6E3 wurden chimäre Mäuse hergestellt, die das rekombinante Cyclin E1-Allel an die Nachkommen vererben und zum Aufbau von Cyclin E1/loxP-Mauslinien dienen.

Das in der Knockout-Maus generierte Allel ist zu einer Spleißvariante von Cyclin E1 analog. Daher wurden im zweiten Ansatz dieser Arbeit Spleißvarianten der murinen Cyclin E1-mRNA identifiziert und auf ihre biologische Funktion überprüft. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß neben der Wildtyp-mRNA noch die als IN3, $\Delta 4$, $\Delta 5$ und $\Delta 3/8$ bezeichneten mRNA-Isoformen gebildet werden. Die Untersuchungen an murinen hepatozellulären Karzinomen bestätigten, daß insbesondere die Wildtyp-Form von Cyclin E1 mit einer Beschleunigung der Zellzyklusprogression von Hepatozyten in Verbindung steht. Die Formen $\Delta 4$ und IN3 haben sich als funktionsfähige Cyclin E1-Derivate erwiesen. In hepatozellulären Karzinomen war eine verlangsamte Tumorphgression mit erhöhten Expressionsniveaus dieser Varianten korreliert.

Die Bedeutung der $\Delta 3/8$ -Variante von Cyclin E1 liegt vornehmlich in der Erhaltung des zellären G0-Zustandes. Die $\Delta 3/8$ -Isoform von Cyclin E1 wurde vorzugsweise in nicht-proliferierenden Hepatozyten exprimiert. Im Leberregenerationsmodell wurde gezeigt, daß $\Delta 3/8$ zellzyklus-abhängig reguliert wird, da nach partieller Hepatektomie der G0-G1-Übergang von Hepatozyten mit einer Reduktion der $\Delta 3/8$ -Expression verbunden war. Die Überexpression von $\Delta 3/8$ *in vitro* bewirkt einen verzögerten Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus. Der Isoform $\Delta 3/8$ fehlt das nukleäre Lokalisationssignal sowie die für die Interaktion bedeutsame Cyclin-Box. Trotzdem ist $\Delta 3/8$ in der Lage, mit cdk2 Komplexe zu bilden, ohne jedoch die Kinaseaktivität des Komplexes zu induzieren. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß $\Delta 3/8$ durch Inaktivierung und Fällung von cdk2 im Zytosol die Zellzyklusprogression inhibiert und Hepatozyten auf diese Weise im G0-Zustand konserviert.

2 Abstract

Cyclin E1 regulates the G1-S-transition of the cell cycle in eucaryotes. In this work the role of Cyclin E1 for the cell cycle in murine hepatocytes was investigated. Two different experimental approaches were used:

In the first part of this work a conditional Cyclin E1-knockout mouse was created. Therefore, initially a modified Cyclin E1 allele was generated *in vitro* by flanking exons 7-9 with loxP-sites and subsequent integrated into the genome of murine ES cells by homologous recombination. Recombinant ES cells from 2 cell lines referred to as 3B7 and 6E3 were used to generate chimaric mice by blastocyte injection. The resulting chimeras showed germ line transmission of the recombinant Cyclin E1 allele and served as founders for Cyclin E1-loxP mouse strains.

The knockout allele resulting from the targeted deletion of exons 7-9 mimics a splice variant of Cyclin E1. Therefore, in the second part of this work splice variants of the Cyclin E1 mRNA were identified and characterized with respect to their biological functions. The results demonstrated that besides the full length mRNA the isoforms referred to as IN3, $\Delta 4$, $\Delta 5$ und $\Delta 3/8$ were generated. Investigations in murine hepatocellular carcinomas (HCC) revealed that especially the wildtype form of Cyclin E1 contributes to the acceleration of the cell cycle progression of hepatocytes. The increased expression of the functional Cyclin E1 isoforms $\Delta 4$ and IN3 were correlated with retarded tumor progression in murine HCCs.

The $\Delta 3/8$ variant is mainly expressed in non-proliferating hepatocytes and is regulated cell cycle-dependent during liver regeneration. After partial hepatectomy the expression of $\Delta 3/8$ decreased in the G0-G1-transition in hepatocytes. In addition the overexpression of $\Delta 3/8$ also leads to a delayed cell cycle reentry *in vitro*. The $\Delta 3/8$ isoform lacks the nuclear localisation signal and the cyclin-box important for protein interactions. Nevertheless $\Delta 3/8$ formed complexes with cdk2, but failed to mediate any kinase activity. The results presented in this work show that $\Delta 3/8$ inhibits the cell cycle progression by inactivation and sequestration of cdk2 in the cytosol. This mechanism contributes to the maintenance of hepatocytes in G0.

3 Einleitung

3.1 Cycline in der Zellzyklusregulation

3. 1. 1. Der eukaryontische Zellzyklus

In der Individualentwicklung des Organismus oder zur Organregeneration des adulten Individuums besitzen eukaryontische Zellen die Fähigkeit zur Zellteilung, der ein als Mitose bekannter Prozeß vorausgeht. In der Mitose entstehen durch proportionale Verteilung der Chromosomen in Verbindung mit der anschließenden Teilung des Zellkörpers, der Zytokinese, zwei genetisch identische Tochterzellen. Jeder Mitose somatischer Zellen geht die Interphase voraus, die aufgrund spezifischer zellulärer Prozesse in die Gap1-Phase (G1-Phase), die Synthese-Phase (S-Phase) und die Gap2-Phase (G2-Phase) unterteilt wird (Abb. 1A). Die Phasen G1 und G2 sind durch Zunahme des Zellvolumens und Mechanismen gekennzeichnet, die die Zellen auf die Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase bzw. auf die Mitose vorbereiten. Störungen dieser Prozesse in Form unvollständiger Replikation der DNA, DNA-Schäden, dem Entzug von Wachstumsfaktoren oder der Fehlpaarung der Metaphase-Chromosomen führen zur Arretierung der Zelle an sogenannten Zellzyklus-Checkpoints. Diese befinden sich in der späten G1-Phase (Restriktionspunkt), am Ende der G2-Phase (G2/M-Checkpoint) oder in der Mitose (Spindel-Checkpoint) (Abb 1A) und dienen dazu, den Zellzyklus solange zu blockieren, bis die aufgetretenen Fehler in der Zelle entweder behoben sind oder ein Selbstmordprogramm zur Eliminierung der betroffenen Zellen führt (dargestellt in SANDHU und SLINGERLAND, 2000; COOPER, 2003; MURRAY, 2004). Diesen zeitlich begrenzten Unterbrechungen des Zellzyklus steht die langfristige mitotische Inaktivierung von Zellen gegenüber, die als G0-Phase (Abb. 1A) bezeichnet wird (COOPER, 2003; LEA et al, 2003).

3. 1. 2 Cycline steuern die Zellzyklusprogression

Der zeitlich Koordination der verschiedenen Prozesse im Zellzyklus wird durch sogenannte Cycline gesteuert. Ihrem Namen entsprechend sind Cycline zyklisch vorkommende Proteine, die in einer definierten Reihenfolge in bestimmten Phasen des Zellzyklus oszillieren (Abb. 1A). Cycline sind die regulatorischen Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) und bilden mit ihren spezifischen Cdk Komplexe, durch die die Phosphorylierungsaktivität der Kinase stimuliert und die Substratspezifität bestimmt wird. Die Phosphorylierung spezifischer Substrate setzt dann die entsprechenden zellzyklusabhängigen Mechanismen in Gang.

Die Cycline der D-Familie (D1, D2 und D3) werden in der frühen und mittleren G1-Phase des Zellzyklus gebildet und binden an cdk4 sowie cdk6 (Abb. 1A). Da die Expression der D-Cycline von Wachstumsfaktoren abhängig ist, stellen die D-Cycline Sensoren dar, durch die extrazelluläre Signale den Zellzyklus modulieren (dargestellt in SHERR, 1994; DRAETTA, 1994; KATO, 1999). Kommt es zu diesem Zeitpunkt zu einem Entzug von Wachstumsfaktoren, werden die Zellen in der G1-Phase arretiert.

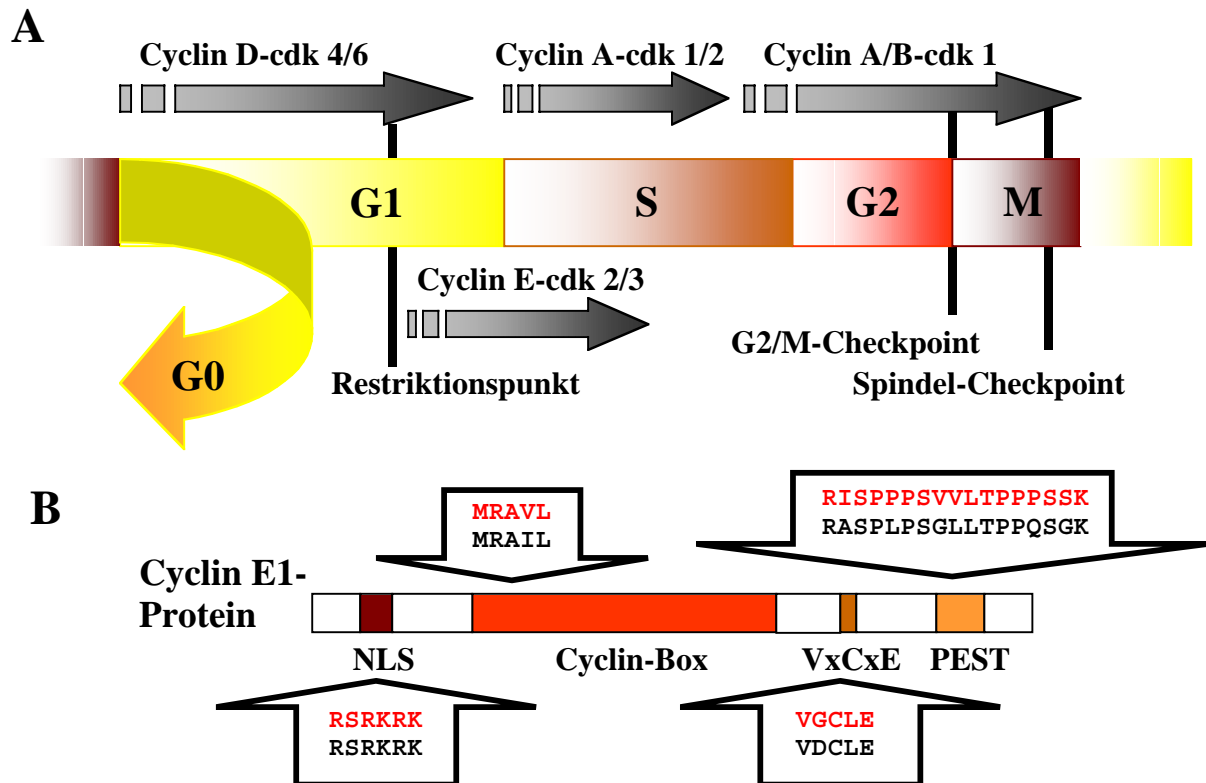


Abbildung 1: Zellzyklus und Cyclin E1-Struktur: **A** Schematische Darstellung der Steuerung des eukaryontischen Zellteilungszyklus durch Cyclin-cdk-Komplexe; **B** Funktionelle Domänen des Cyclin E1-Proteins von Mensch und Maus, NLS: nukleäres Lokalisationssignal; VxCxE: pRB-Bindungsdomäne; PEST: Degradationssignal; rot: murine Aminosäuresequenz in der entsprechenden Domäne.

In der späten G1-Phase geht die Steuerung von den D-Cyclinen am Restriktionspunkt an die E-Cycline über (Abb. 1A). Nach Überschreiten des Restriktionspunkts ist die weitere Zellzyklusprogression unabhängig von Wachstumsfaktoren. Werden Zellen durch Serumentzug Wachstumsfaktoren entzogen, vollenden sie trotzdem die Mitose und werden erst in der nächsten G1-Phase arretiert. Bei ungestörter Zellzyklusprogression beginnt jenseits des Restriktionspunkts die Akkumulation der E-Cycline, die ihr Maximum im G1-S-Übergang haben und in der S-Phase wieder abgebaut werden (DULIC, LEES und REED, 1992; KOFF et al, 1992; DOU et al, 1993; EKHOLM et al, 2001). Die Cycline E1 und E2 bilden Komplexe mit cdk2 bzw. cdk3 (Abb. 1A) (dargestellt in SHERR, 1994; DRAETTA, 1994; KOFF et al, 1991; LEW, DULIC und REED, 1991) und steuern die Kinaseaktivität und Substratspezifität der Cyclin E/cdk-Komplexe (HIGASHI et al, 1995; HORTON und TEMPLETON, 1997; GEISSEN und MÖRÖY, 2002), deren Funktionen als Koordinatoren des G1-S-Übergangs später besprochen werden. In der S-Phase bestimmen die A-Cycline in Komplexen mit cdk2 und cdk1 den Fortgang des Zellzyklus (MURPHY et al, 1997; LIU et al, 1998), während in der folgenden G2-Phase Komplexe von Cyclin A und Cyclin B mit cdk1 die Steuerung übernehmen (dargestellt in SHERR, 1993). Nach Erreichen des Checkpoints am G2-M-

Übergang kontrollieren Cycline der B-Familie (Abb. 1A) alleine den Ablauf der Mitose (BRANDEIS et al, 1998; dargestellt in SHERR, 1993, SANDHU und SLINGERLAND, 2000).

3. 1. 3 Die Gene der Cyclin E-Familie in Mensch und Maus

Die mRNA des humanen Cyclin E1-Gens wurde 1991 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen entdeckt und als G1-Regulator klassifiziert, da Cyclin E1 in der Lage war, den Ausfall von G1-Cyclinen (CLN) in Hefen zu kompensieren (KOFF et al, 1991; LEW, DULIC und REED, 1991). Drei Jahre später wurde die mRNA des murine Cyclin E1-Gens identifiziert (DAMJANOW et al, 1994). Der 5' Bereich des Cyclin E1-Gens der Maus wurde bereits 1996 sequenziert. Die vollständige Sequenz von Cyclin E1 wurde allerdings erst in der hier vorliegenden Arbeit aufgeklärt. Als zweites Mitglied der Cyclin E-Familie wurde zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen das Cyclin E2-Gen von Mensch und Maus nachgewiesen (LAUPER et al, 1998; ZARIWALA et al, 1998).

Die enge Verwandtschaft der Cyclin E-Gene wurde durch Sequenzvergleiche auf Ebene der cDNAs und der daraus abgeleiteten Aminosäuren belegt. Es konnte gezeigt werden, daß sich die kodierende Sequenz der Cyclin E-Gene einheitlich auf auf 12 Exons verteilt (PARISI et al, 2003; ZSCHEMISCH, unpublizierte Daten). Die Cyclin E1-cDNAs von Maus und Mensch weisen eine Sequenzhomologie von insgesamt 75% auf. Auf Ebene der Aminosäuren beträgt die Homologie 67%, wobei in der hoch konservierten Cyclin-Box (Abb. 1B) eine Sequenzidentität von 92% erreicht wird (DAMJANOW et al, 1994). Die cDNA-Sequenzen von humanem und murinem Cyclin E2 stimmen zu 94% überein (Gudas et al, 1999), wobei für die Aminosäuresequenzen von Cyclin E2 von Mensch und Maus eine Sequenzhomologie von 92% errechnet wurde (LAUPER et al, 1998). Die Aminosäuresequenz des humanen Cyclin E2 ist insgesamt zu 47% und in der Cyclin-Box zu 75% zu E1 homolog (ZARIWALA et al 1998; GUDAS et al, 1999). Der Homologievergleich der E-Cycline verschiedener Tierarten hat gezeigt, daß die sehr eng verwandten Cyclin E2-Gene wahrscheinlich durch Genduplikation früh in der Entwicklung der Vertebraten aus dem älteren Cyclin E1-Gen entstanden sind (LAUPER et al, 1998).

Über die Sequenzhomologien hinaus weisen die Cyclin E-Gene auch eine einheitliche Strukturierung der funktionellen Domänen auf, die hier beispielhaft an der Proteinstruktur für die Cyclin E1-Gene von Mensch und Maus dargestellt werden soll (Abb. 1B). Die Cyclin E1-Proteine von Mensch und Maus umfassen 410 bzw. 408 Aminosäuren. Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich das nukleäre Lokalisationssignal, RSRKRK (Abb. 1B), das in Exon 3 kodiert ist und für den Transport von Cyclin E1 durch das α/β -Importin-System in den Zellkern verantwortlich ist (MOORE et al, 1999; MOORE, KORNBLUTH und HUNT, 2002). Die Exons 6-8 enthalten die Sequenz für die Cyclin-Box-Domäne (Abb. 1B), die als essentieller Teil die am höchsten konservierte Struktur innerhalb der Cyclin-Genfamilie darstellt. Dies gilt besonders für das MRAIL-Motiv am Beginn der Cyclin-Box, daß verantwortlich ist für die Bindung an CDC6, p21 und p27 (SCHULMAN, LINDSTROM und HARLOW, 1998; FURSTENTHAL et al, 2001; DONOVAN, ROTHENSTEIN und SLINGER-

LAND, 2002; dargestellt in PAYTON und COATS, 2002). Durch die spezifische Faltung der Cyclin-Box ist das Cyclin-Protein in der Lage, seinen cdk-Partner zu binden und dessen Phosphorylierungsaktivität zu stimulieren (BAZAN, 1996; HORTON und TEMPLETON, 1997; NOBLE et al, 1997). C-terminal der Cyclin-Box wurde das VxCxE-Motiv (Abb. 1B) identifiziert, daß als RB-Bindungsdomäne einen entscheidenden Einfluß auf die Bindung von Cyclin E an das Retinoblastoma-Protein pRB hat. pRB ist eines der wichtigsten Substrate des Cyclin E/cdk2-Komplexes, wird durch Phosphorylierung inaktiviert und setzt den zuvor an pRB gebundenen pro-mitogenen Transkriptionsfaktor E2F-1 frei, der wiederum den Zellzyklus antreibt (Abb. 2) (KELLY, WOLFE und ROBERTS, 1998; dargestellt in ADAMS, 2001). Im c-terminalen Bereich der Cyclin E-Proteine von Mensch und Maus wurde das PEST-Motiv (Abb. 1B) charakterisiert (KOFF et al, 1991; LEW, DULIC und REED, 1991; NUGENT et al, 1991; DAMJANOW et al, 1994), das reich ist an basischen Resten der Aminosäuren Prolin, Leucin, Serin und Threonin. Durch Phosphorylierung der Serin/Threonin-Reste im PEST-Motiv wird die Degradation des Cyclin E1-Proteins durch den SCF-Komplex lizenziert (KOFF et al, 1991; LEW, DULIC und REED, 1991; WELCKER et al, 2003; dargestellt in NAKAYAMA, HATAKEYAMA und NAKAYAMA, 2001).

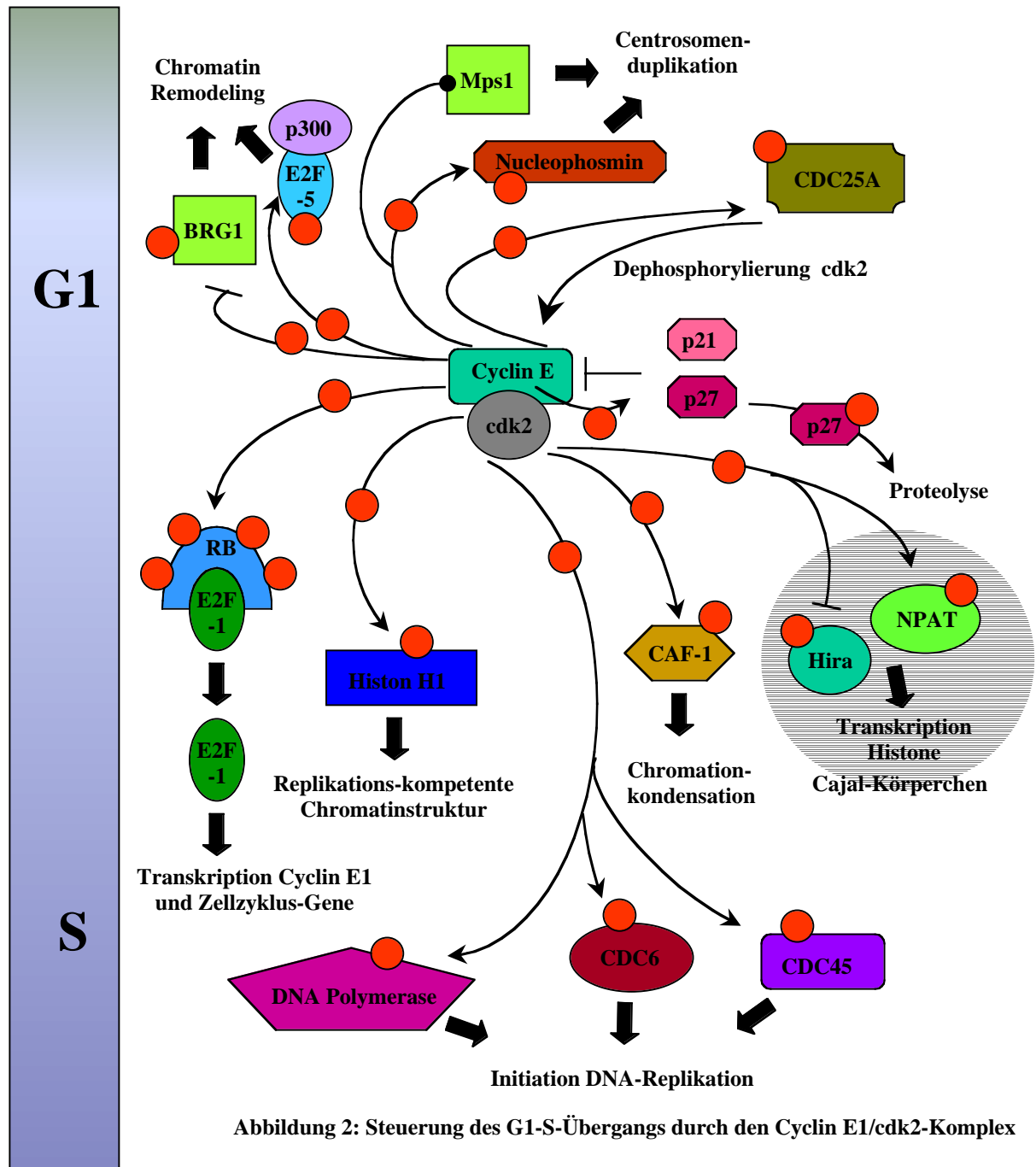
3. 1. 4 Regulation der Expression und proteolytischen Degradation von Cyclin E

Die Transkription von Cyclin E1 und E2 ist in der Maus durch Northern-Blot-Analysen im ZNS sowie in Milz, Hoden, Thymus und Darm adulter Tiere nachgewiesen worden und entspricht genau dem Expressionsprofil in humanen Geweben (DAMJANOW et al, 1994; ZARIWALA et al, 1998; GENG et al, 2001).

Die Expression von Cyclin E1 in der späten G1-Phase und im G1-S-Übergang wird hauptsächlich vom Transkriptionsfaktor E2F-1 induziert (OHTANI et al, 1995; BOTZ et al, 1996; GENG et al, 1996; dargestellt in KATO, 1999). Zusätzlich wird die Transkription von Cyclin E durch die Transkriptionsfaktoren Prox-1 und c-myc stimuliert (JANSEN-DÜRR et al, 1993; PETROVA et al, 2002). In G0 und in der frühen G1-Phase wird die Transkription von Cyclin E1 durch E2F-abhängige Chromatinmodifizierung im Promotor aktiv reprimiert (NIELSEN et al, 2001; POLANOWSKA et al, 2001; MORRISON et al, 2002; ZHANG et al, 2000, ZHANG et al, 2001). Die Bindung des Transkriptionsfaktors WT1 im Promotor führt ebenfalls zu verminderter Cyclin E1-Transkription (LOEB et al, 2002).

Haben die E-Cycline ihre Koordinationsfunktionen in G1-S-Übergang erfüllt, werden die Proteine abgebaut. Dies geschieht durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Das Cyclin E-Protein wird als Voraussetzung für die Proteolyse durch die Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK 3 β) und Cyclin E1/cdk2-Komplexe an Threonin 62, Serin 384 und Threonin 380 phosphoryliert bzw. autophosphoryliert. Cyclin E1 wird dann durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) und das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) ubiquitiniert, dem SCF-Komplex zugeführt und im 26S-Proteasom abgebaut (SINGER et al, 1999; KOEPP et al, 2001; WELCKER et al, 2003; dargestellt in WINSTON, CHU und

HARPER, 1999; NAKAYAMA, HATAKEYAMA und NAKAYAMA, 2001). Cyclin E2 wird ebenfalls durch Ubiquitin-Proteasom-System nach Phosphorylierung am Threonin 392 degradiert (ZARIWALA, 1998).



3. 1. 5 Cyclin E1 als Koordinator des G1-S-Übergangs

Die Hauptaufgabe der Cyclin E1/cdk2-Komplexe im G1-S-Übergang liegt in der Synchronisierung der Initiation der DNA-Replikation, des Chromatin Remodelings, der Histonbiogenese und der Centrosomenduplikation. Hinzu kommt die Koordination E2F-abhängiger Programme und die Autoregulation der Aktivität des Cyclin E1/cdk2-Komplexes durch positive oder negative “feedback loops“ (Abb. 2). Die wichtigsten Substrate des Cyclin E1/cdk2-Komplexes und deren Funktion im Rahmen des Zellzyklus sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Abbildung 2 dargestellt.

Die drei wichtigen Zielproteine des Cyclin E1/cdk2-Komplexes pRB, p27 und CDC25A bilden Rückkopplungsschleifen (feedback loops), die wiederum die Aktivität des Cyclin/cdk-Komplexes regulieren (Abb. 2):

Das **Retinoblastoma-Protein pRB** ist ein Tumorsuppressor und negativer Regulator des Zellzyklus. Im hypophosphorylierten Zustand in G0 oder im G1-Arrest bindet pRB die aktivierenden Transkriptionsfaktoren E2F-1 und E2F-2. Mit dem Eintritt in den Zellzyklus wird pRB durch Cyclin D/cdk-Komplexe phosphoryliert und beginnt E2F freizusetzen. Dieses freie E2F stimuliert durch Bindung an den Cyclin E1-Promotor die Transkription von Cyclin E1 und trägt zur Bildung von Cyclin E1/cdk2-Komplexen bei. Nachfolgend phosphorylieren die Cyclin E1/cdk2-Komplexe pRB an den Aminosäureresten Threonin 821 und Serin 567, so daß der hyperphosphorylierte, inaktive Zustand von pRB erreicht bzw. erhalten wird und E2F weiterhin frei vorliegt. Heute herrscht die Meinung vor, daß die Phosphorylierung von pRB als sequentieller Prozeß durch die Cyclin D/cdk-Komplexe begonnen und durch Cyclin E/cdk2-Komplexe vollendet wird (GRANA, GARRIGA und MAYOL, 1998; dargestellt in VIDAL und KOFF, 2000; ADAMS, 2001; COOPER und SHAYMAN, 2001). Freies E2F stimuliert neben der Cyclin E1-Expression auch die Transkription der Gene c-myc, n-myc, c-myb, CDC 6, CDC 45, MCM 2-7, DBF4, Thymidin-Synthetase, Dihydrofoleatreduktase (DHFR) und Cyclin A, die wichtige Steuerungselemente und Effektoren des Zellzyklus sind (dargestellt in BEIJERSBERG und BERNARDS, 1996; WOO und POON, 2003).

p27 bildet zusammen mit p21 und p57 die CIP/KIP-Familie von Zellzyklus-inhibitoren, deren Mitglieder in der Lage sind, durch stöchiometrische Bindung Komplexe aus Cyclin D/cdk oder Cyclin E/cdk durch Bindung zu inaktivieren (KWON und NORDIN, 1998; dargestellt in PETER und HERSKOWITZ, 1994; VIDAL und KOFF, 2000). In der G1-Phase titrieren Cyclin D/cdk-Komplexe freies p27 ab und ermöglichen die Aktivität von Cyclin E1/cdk2-Komplexen, die für die endgültige Inaktivierung und den Abbau von p27 sorgen (ZERFASS-THOME et al, 1997; dargestellt in SHERR, 1994, 2000; KATO, 1999). Dabei wird p27 von Cyclin E1/cdk2-Komplexen am Threonin 187 phosphoryliert, wodurch die Degradation von p27 über das selbe Ubiquitin-Proteasom-System eingeleitet wird, das auch Cyclin E1 abbaut (MORISAKI et al, 1997; VLACH et al, 1997; XU et al, 1999).

Die Phosphatase **CDC25A** aktiviert den Cyclin E1/cdk2-Komplex durch Entfernung der inhibitorischen Phosphatgruppen an Threonin 14 und Tyrosin 15. Die aktivierten Cyclin E/cdk2-Komplexe wiederum aktivieren CDC25A durch Phosphorylierung im G1-S-Übergang (HOFFMANN, DRAETA und KARSENTI, 1994; SANDHU et al, 2000; dargestellt in SANDHU und SLINGERLAND, 2000).

Tabelle 1: Substrate des Cyclin E1/cdk2-Komplexes und deren Funktion im Zellzyklus

Substrat	Modifikation durch Cyclin E/cdk	Funktion	Literatur
Histon H1	Phosphorylierung	offenere Chromatinstruktur zur DNA-Replikation	CONTRERAS et al, 2003
NPAT	Phosphorylierung	Histontranskription	GAO et al, 2003; YE et al, 2003; WEI et al 2003; dargestellt in EWEN, 2000
HIRA	Phosphorylierung	Histontranskription	NELSON et al, 2003
CDC6	Phosphorylierung	Bildung des Pre-Replikationskomplexes	FURSTENTHAL et al, 2001; COVERLEY, LAMAN und LASKEY, 2002
CDC45	Phosphorylierung	Bildung des Pre-Replikationskomplexes	JARES und BLOW, 2000; ZOU und STILLMAN, 2000; dargestellt in WOO und POON, 2003
DNA Polymerase α Primase	Phosphorylierung	Initiation der DNA-Replikation	VOITENLEITNER et al, 1999; DEHNE et al, 2001
BRG1	Phosphorylierung	Chromatin Remodeling	SHANAHAN et al, 1999; HENDRICKS, SHANAHAN und LEES, 2004
E2F-5/p300	Phosphorylierung	Chromatin Remodeling	MORRIS, ALLEN und LA THANGUE, 2000; BANDYOPADHYAY et al, 2002
CAF-1	Phosphorylierung	Chromatin-Kondensation	KRUDE und KELLER, 2000; KELLER und KRUDE, 2001
BRCA1	Phosphorylierung	Centrosomenduplikation	RUFFNER et al, 1999; DENG et al, 2002
Nucleophosmin	Phosphorylierung	Centrosomenduplikation	OKUDA et al, 2000; HINCHCLIFFE und SLUDER, 2002; TARAPORE, OKUDA und FUKUSAWA, 2002
Mps1	Bindung	Centrosomenduplikation	HINCHCLIFFE und SLUDER, 2001; FISK, MATTISON und WINEY, 2003

3. 1. 6 Regulation der Aktivität des Cyclin E1 durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikation

Alternative Spleißvorgänge an der pre-mRNA, die durch variable Spleißmuster die Vielfältigkeit und Flexibilität von Proteinen erhöhen, spielen eine zentrale Rolle in der eukaryontischen Genregulation (überblickt in MANIATIS und TASIC, 2002; ROBERTS und SMITH, 2002; COCHET et al, 2003). Für 35-60% der humanen Gene konnte bisher zumindest eine alternativ gespleißte Isoform identifiziert werden (dargestellt in

ROBERTS und SMITH, 2002; COCHET et al, 2003). Das Spleißen der pre-mRNA wird durch das Spleisosom ausgeführt, ein Komplex aus small nuclear RNAs (snRNA) und assoziierten Proteinen, der sich an die intronischen 5'- und 3'-Spleißsequenzen anlagert und durch Bildung einer sogenannten Lasso-Struktur an der Verzweigungsstelle das Intron eliminiert.

Es konnte gezeigt werden, daß Proteine, die von alternativ gespleißten mRNAs kodiert werden, verschiedene Erkrankungen des Menschen wie Spinale Muskelatrophie und Zystische Fibrose verursachen können. Beispielhaft für eine Vielzahl humaner Krebserkrankungen sind Karzinome der Brust (BRCA1 und BRCA 2), des Magens (CD44) und der Prostata (Bcl-2) zu erwähnen, die durch alternativ gespleißte Genprodukte induziert werden (dargestellt in CACERES und KORNBLIHTT, 2002; NISSIM-RAFINIA und KEREM, 2002).

Alternatives Spleißen ist auch ein weiterer Mechanismus zur funktionellen Regulation der Cycline. Alternativ gespleißte Transkripte von Cyclin C und von Cyclin T konnten identifiziert werden (LI, LAHTI und KIDD, 1996; DE LUCA et al, 2002). Intensiv sind die alternativ gespleißten Transkripte des humanen Cyclin E1 untersucht worden. Durch Deletion einzelner Exons bzw. von kurzen Exonabschnitten, aber auch durch Insertion wurden mRNA-Isoformen generiert, deren Proteine ein abgewandeltes Expressionsprofil (Isoform ET, MUMBERG et al, 1997) oder eine veränderte Substratspezifität und Phosphorylierungsaktivität in Komplexen mit cdk2 aufwiesen (Isoform $\Delta 48$, PORTER und KEYOMARSI, 2000). Durch Trunkierung der Cyclin-Box durch Deletion des Exon 7 (Isoform Es, SEWING et al, 1994) oder des Exon 9 (Isoform ET, MUMBERG et al, 1997) wurden funktionslose Cyclin E1-Derivate erzeugt. Durch Eliminierung der PEST-Sequenz (Isoform $\Delta 148$, KEYOMARSI et al, 1995) entsteht eine hyperaktive Isoform, die nicht abgebaut werden kann. Neben den beschriebenen Isoformen wurden weitere alternativ gespleißte mRNA-Varianten charakterisiert, deren biologische Funktionen weitgehend ungeklärt ist (OTHSUBO et al, 1995). Auch für das humane Cyclin E2-Gen konnte eine alternativ gespleißte mRNA, E2sv, nachgewiesen werden (GUDAS et al, 1999). Diese Befunde untermauern die Hypothese, daß durch alternatives Spleißen Varianten mit modifizierten Funktionen entstehen, durch die eine Feinabstimmung des Zellzyklus möglich ist.

Das Vorkommen und die mögliche Funktion von alternativ gespleißten mRNA-Varianten von murinem Cyclin E1 oder E2 waren bisher kaum Gegenstand der Forschung. Said und Medina zeigten allerdings, daß in murinen Mamma-Karzinomen mehrere verkürzte Cyclin E1-Proteine vorkommen (SAID und MEDINA, 1995). Diese Proteine können auf alternativ gespleißten mRNA-Varianten von Cyclin E1 beruhen oder durch posttranslationale Prozessierung entstanden sein. In humanen Tumoren aus Brust und Ovar sind eine Reihe N-terminal trunkierter, hyperaktiver Cyclin E1-Proteine (Low Molecular Weight (LMW)-Formen) identifiziert worden, die tumorspezifisch durch Spaltung durch die Proteasen Elastase oder Calpain erzeugt wurden (KEYOMARSI et al, 1995; PORTER et al, 2001; WANG et al, 2003; BEDROSIAN et al, 2004; dargestellt in STIGHALL, BERGLUND und LANDBERG, 2003). Mazumder und Mitarbeitern gelang es, eine humane Cyclin E1-Varinate mit nur 18 kDA Molekulargewicht zu isolieren, die durch Caspase 3-Spaltung am C-Terminus entstanden ist und pro-apoptotische Funktion

besitzt (MAZUMDER et al, 2002). Die posttranslationale Modifikation von Cyclin E1-Proteinen führt zu einer weitgehenden Funktionsänderung, die häufig mit der neoplastischen Transformation von Zellen verbunden ist.

3. 1. 7 Cyclin E1 und Cyclin E2 in der Tumorgenese

Die Akkumulation von Mutationen in Zellen kann zu deren neoplastischer Transformation führen. Werden durch Mutation Tumorsuppressorgene, die zu Apoptose oder zum Zellzyklusarrest führen, bei gleichzeitiger Aktivierung von Onkogenen, die die Zellproliferation stimulieren, ausgeschaltet, entsteht Krebs (dargestellt in GRISHAM, 1996; FEARON, 1997; PROBER und EDGAR, 2001; MACALUSO, PAGGI und GIORDANO, 2003).

Durch Amplifikation, Überexpression und Abkopplung von der Zellzykluskontrolle trägt Cyclin E1 zur Tumorprogression bei (KEYOMARSI und PARDEE, 1993; YERLY-MOTTA et al, 1999; RICHTER et al, 2000; SANDHU und SLINGERLAND, 2000; XIANGMING et al 2000; GENG et al, 2001; ELANDSON et al, 2003; SCHRAML et al, 2003). Überexpression von Cyclin E1 verursacht eine Verkürzung der G1-Phase mit beschleunigtem Übertritt von Zellen in die S-Phase bei geringerem Zellvolumen und einer zunehmenden Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (OHTSUBO und ROBERTS, 1993; RESNITZKY et al, 1994; WIMMEL et al, 1994; RESNITZKY und REED, 1995).

In humanen wie in murinen Tumoren ist die Überexpression von Cyclin E1 mit beschleunigtem Tumorwachstum korreliert (YERLY-MOTTA et al, 1999). Dies gilt auch für das hepatozelluläre Karzinom (HCC). In fast 70% der untersuchten HCCs lag Cyclin E1 überexprimiert vor (PENG, CHOU und HSU, 1998; KIM et al, 2000, KOHZATO, 2001; JUNG et al, 2001; OHASHI et al, 2001; ARMENGOL et al, 2003; ZHOU, HE und LIANG, 2003). Jung und Mitarbeiter wiesen zudem nach, daß die Überexpression von Cyclin E1 in HCCs mit der Amplifikation des Cyclin E1-Gens verbunden ist (JUNG et al, 2001).

Verstärkte Cyclin E1-Expression führt in Krebszellen durch Hyperamplifikation der Centrosomen zu genetischer Instabilität mit chromosomalen Abberationen und Aneuploidie (SPRUCK, WON und REED, 1999; MUSSMAN et al, 2000; KRÄMER, NEBEN und HO, 2002; HUBALEK et al, 2004, dargestellt in LENGAUER, KINZLER und VOGELSTEIN, 1998).

Untersuchungen belegen, daß bei Krebspatienten die Überexpression von Cyclin E1 mit einer deutlich schlechteren Prognose korreliert. Dies gilt besonders für solche hormonsensitiven Krebsformen (Brust, Ovar), in denen Überexpression der aggressiven LMW-Formen von Cyclin E1 nachgewiesen wurde (KEYOMARSI et al, 2002). Auch in der Entwicklung kleinzelliger Blasenkarzinome sowie endometrialer und kolorektaler Karzinome ist die Deregulation von Cyclin E1 ein entscheidender Faktor (XIANGMING et al 2000; JIA-QING, 2001; SCHRAML et al, 2003; LINDAHL et al, 2004).

Die Untersuchungen zur Bedeutung von Cyclin E2 in der Tumorgenese stehen noch am Anfang. Bisher wurde nur gezeigt, daß die Cyclin E2-Überexpression in humanem

Brustkrebs und Lungenkrebs (SCLC) von Bedeutung ist (GUDAS et al, 1999; GENG et al, 2001; PAYTON et al, 2002).

3. 1. 8 Cyclin E1 in der Leberregeneration

In der adulten Leber von Säugetieren befinden sich die meisten Hepatozyten in der G0-Phase des Zellzyklus und führen zentrale Stoffwechselprozesse wie Glukosemetabolismus, Entgiftungsprozesse, Regulation des Säure-Base-Haushalts, Produktion der Gallenflüssigkeit und Abbau von Blutbestandteilen aus, die für den Organismus lebenswichtig sind. Als eines der wenigen Organe besitzt die Leber die Fähigkeit, durch kompensatorische Hyperplasie den Verlust von Lebergewebe, wie er in der Natur durch Gifte in der Nahrung verursacht wird, und damit von Stoffwechselkapazität, zu rekonstituieren (dargestellt in MICHALOPOULOS und DeFRANCES, 1997; FAUSTO, 2000). An der Regeneration des Lebergewebes sind neben den Hepatozyten auch Kupffer-, Ito- und Endothelzellen sowie Cholangiozyten beteiligt (dargestellt in FAUSTO, 2000). Experimentell wird diese Fähigkeit im Modell der partiellen Hepatektomie (PH) an Ratten und Mäusen ausgenutzt, in dem durch operative Entfernung von 2/3 der Lebermasse ein starker Proliferationsstimulus erzeugt wird. In Intervallen von 12 Stunden treten Spitzen der DNA-Synthese in Hepatozyten auf, die jeweils den erneuten Phasen mitotischer Aktivität entsprechen (dargestellt in MICHALOPOULOS und DeFRANCES, 1997; FAUSTO, 2000). 75-90% der Hepatozyten der verbleibenden Leber führen dabei 1-2 Zellteilungen durch. 72 Stunden nach PH ist die Expansion der Leberzellen abgeschlossen. Es schließt sich eine Phase an, in der die funktionsfähige Struktur der Leber rekonstituiert wird. Nach 5-7 Tagen kommt der Prozeß der Leberregeneration zum Abschluß (dargestellt in MICHALOPOULOS und DeFRANCES, 1997; FAUSTO, 2000).

Mit dem Eintritt in den Zellzyklus nimmt die Expression von Cyclin E1 in der Leber von Mäusen 12 Stunden nach PH deutlich zu und erreicht nach 48 Stunden das Maximum, um bis zum Zeitpunkt 72 Stunden wieder deutlich abzusinken. Diese Phasen korrelieren mit den Schüben hepatozellulärer DNA-Synthese (WÜSTEFELD et al, 2000; LÜDDE et al, 2001). Die partielle Hepatektomie stellt damit ein einzigartiges Modell dar, in dem am adulten Organismus kontrolliert der Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus studiert werden kann.

3. 1. 9 Kompensation und Redundanz: Inaktivierung von Cyclin E1, Cyclin E2 und cdk2 in der Maus

Aufgrund der hier dargestellten, weitreichenden Funktionen und Aufgaben der E-Cycline wurde bisher davon ausgegangen, daß sowohl Cyclin E1 als auch cdk2 nicht nur *in D. melanogaster* sondern auch in Säugetieren essentiell sei. Im Jahr 2003 wurden fast zeitgleich die Charakterisierung der konstitutiven Cyclin E1- und Cyclin E2- sowie der konstitutiven Cdk2-Knockout-Maus publiziert (BERTHET et al, 2003; GENG et al, 2003; ORTEGA et al, 2003; PARISI et al, 2003). Diese Ergebnisse relativieren viele Dogmen der Zellzyklusregulation. Entgegen allen Erwartungen ist die Inaktivierung der

einzelnen E-Cycline oder von *cdk2* nicht lethal. Der Doppel-Knockout von Cyclin E1 und E2 führt zur intrauterinen Lethalität zwischen Tag 10,5 und 11,5 *post coitum* aufgrund einer Fehlentwicklung der Plazenta, deren Trophoblastriesenzellen die Fähigkeit zur Endoreplikation verloren haben. Trophoblastriesenzellen sind an der Implantation des Embryos beteiligt und produzieren dazu notwendige Hormone und Zytokine (PARISI et al, 2003). Zuvor war gezeigt worden, daß Cyclin E1 essentiell für die Endoreplikations-Prozesse in der Embryogenese von *D. melanogaster* ist (KNOBLICH et al, 1994; WENG et al, 2003). Durch tetraploide Komplementation konnten jedoch E1/E2-Doppelknockout-Embryonen generiert werden, die aber *in utero* durch Fehlbildungen des Herz-Kreislauf-Systems oder direkt *post natal* starben.

Der homozygote Cyclin E1-Knockout verursachte keine Veränderung des adulten Phänotyps. Männliche Cyclin E2-Knockout-Mäuse waren aufgrund einer testikulären Hypoplasie mit verminderter Hodengröße und reduzierter Spermienzahl steril. Bei *cdk2*-Knockout-Mäusen bewirkte die homozygote Inaktivierung aufgrund defekter Keinzellentwicklung und Meiose die Sterilität beider Geschlechter.

In vitro-Untersuchungen an primären Fibroblasten, die aus Cyclin E1/E2-Doppelknockout-Embryonen gewonnen wurden, ergaben, daß die Cyclin E-Defizienz zu einer verminderten Proliferationsrate, beschleunigter Seneszenz und einer erhöhten Resistenz gegen onkogene Transformation durch Myc und Ras führte (GENG et al, 2003). Essentiell sind die E-Cycline für den Wiedereintritt von Zellen aus dem G1-Arrest in den Zellzyklus. Die Cyclin E-Defizienz verhindert die cyclin-abhängige Rekrutierung der MCM-Proteine durch den Pre-Replikationskomplex und unterbindet dadurch die DNA-Replikation bzw. die Zellteilung (GENG et al, 2003).

Aus diesen Befunden erschließt sich, daß Cyclin E2 und *cdk2* wichtige Funktionen in der Keimzellbildung übernehmen, die durch kein anderes Gen komplementiert werden können. Da in den Einzelknockouts diese Defekte nicht auftreten, kann von einer Kompensation zwischen Cyclin E1 und E2 ausgegangen werden.

Da in Cyclin E1/E2-defizienten und *cdk2*-defizienten Mäusen die zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von pRB in somatischen Zellen nicht vermindert ist (GENG et al, 2003; ORTEGA et al, 2003), muß die Beteiligung weiterer, bisher unbekannte Kinasen an der funktionellen Kompensation postuliert werden.

3.2 “Gene Targeting“: Strategien zur genetischen Manipulation muriner Embryonen

Labormäuse werden als experimentelle Tiermodelle seit Beginn des 20. Jahrhunderts gezüchtet. Die hohe Reproduktionsrate dieser Tiere, ihre kurze Generationszeit und ihre relativ einfache, kostenextensive Tierhaltung prädestinierten die Labormaus zum optimalen Versuchstier. Daher wurde die Labormaus zu einem der physiologisch und genetisch am besten untersuchten Säugetiere. Umfangreiche Kenntnisse der murinen Genetik und Physiologie ermöglichten verschiedenartige genetische Manipulationen an Mäusen, die die Grundlage der Untersuchung der Genfunktionen bilden.

Störungen und Fehlentwicklungen, die durch die Eliminierung eines Gens verursacht werden, können über dessen Funktion im Organismus Auskunft geben. Idealerweise wird

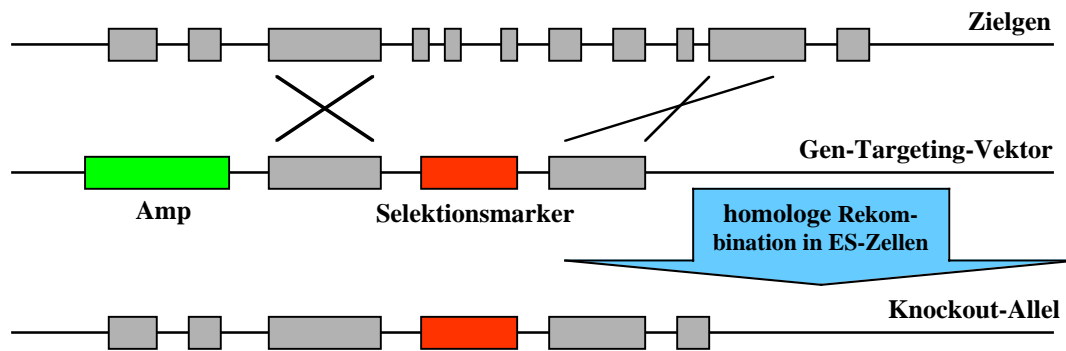


Abbildung 3: Strategie zum konstitutiven Gen-Knockout in der Maus

dazu das zu untersuchende Gen mit Hilfe künstlich eingebrachter DNA-Sequenzen entweder konstitutiv oder konditional inaktiviert (Abb. 3)(Gene Targeting) (dargestellt in CAPECCHI, 1989; ROTH et al, 1999; NAGY, 2000; BOCKAMP et al, 2002; KWAN, 2002; LEWANDOWSKI, 2002). Grundlage dieses sogenannten Knockouts ist es, eine genetische Veränderung in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus einzubringen, die anschließend in Blastozysten injiziert werden. Ergebnis dieses Prozesses sind chimäre Nachkommen, die die genetische Veränderung vererben, wenn die Keimzellen Abkömmlinge der manipulierten ES-Zellen sind (Keimbahntransmission). Im konstitutiven Knockout wird ein spezifisches Genkonstrukt mittels Elektroporation in ES-Zellen transfiziert, so daß durch homologe Rekombination (dargestellt in VASQUEZ et al, 2001; WEST, 2003; HELLEDAY, 2003) essentielle Teile des Gens durch einen Selektionsmarker (Neomycin, Hygromycin oder GFP) substituiert werden (Abb. 3). Ein solcher homozygoter Knockout betrifft jede Körperzelle und kann zur embryonalen Lethalität führen, wenn das entsprechende Gen ein essentieller Teil der Ontogenese ist.

Embryonale Lethalität aufgrund der erzeugten Gendefizienz kann durch den konditionalen Knockout umgangen werden. In Abwandlung wird der essentielle Teil des Gens, dessen Deletion zur Inaktivierung führen soll, im Vorgang der homologen Rekombination in ES-Zellen mit loxP-Erkennungssequenzen für die Rekombinase Cre aus dem Bakteriophagen P1 flankiert und zugleich ein durch loxP-Erkennungssequenzen flankierter Selektionsmarker in die Zellen eingebracht (Abb. 4A) (SAUER und HENDERSON, 1988; 1989; GU, ZOU und RAJEWSKI, 1993; KÜHN et al, 1995). In diesem 3-loxP-Modell (Abb. 4A) wird anschließend der Selektionsmarker durch Transfektion der Cre-Rekombinase *in vitro* aus dem rekombinanten Allel eliminiert. Die finale Inaktivierung des homozygoten, rekombinanten Gens an sich findet durch Verpaarung mit transgenen Mäusen statt, die die Cre-Rekombinase entweder ubiquitär, zelltypspezifisch oder induzierbar (z. B. Interferon- α -abhängiges Mx-Cre) exprimieren (Abb. 4A).

In der 2loxP-2FRT-Strategie (Abb. 4B) wird der Selektionsmarker mit FRT-Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* flankiert, so daß selektiv *in vitro*, durch Transfektion der FLP-Rekombinase in ES-Zellen, oder *in vivo*, durch Verpaarung mit FLP-transgenen Mäusen, der Selektionsmarker deletiert wird (DYMECKI, 1996;

BUCHHOLZ, ANGRAND und STUART, 1998; FARLEY et al, 2000; TAKEUCHI et al, 2002). Im Folgenden wird durch Kreuzung der rekombinanten Maus mit einer Cre-transgenen Maus das Gen durch Deletion des loxP-flankierten Genabschnitts endgültig inaktiviert (Abb. 4B). Diese komplexen Manipulationen ermöglichen die Untersuchung der Defizienz eines Gens selektiv und induzierbar zu einem definierten Zeitpunkt und in einem speziellen Zelltypus.

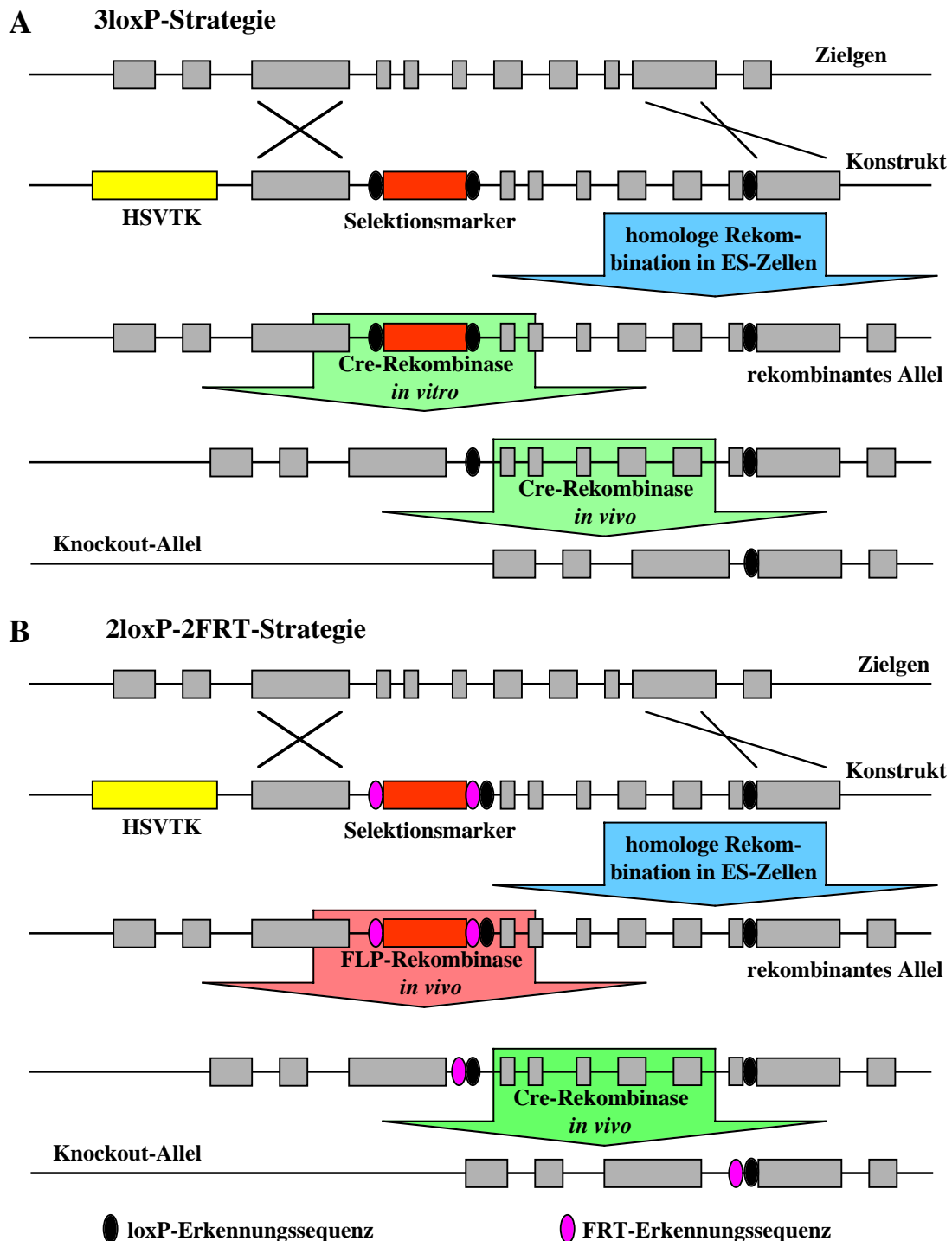


Abbildung 4: Strategien zum konditionalen Gen-Targeting in der Maus

3.3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Cyclin E1 für die Zellzyklusregulation von Hepatozyten zu untersuchen. Insbesondere sollte hierzu eine konditionale Cyclin E1-Knockout-Maus generiert werden. In Kombination mit der konstitutiven Cyclin E2-Knockout-Maus wird es möglich sein, die Bedeutung der E-Cycline im regulären Zellzyklus und in der Transition von G0/G1-Arrest in den Zellzyklus an adulten Zellen zu bestimmen. Die konditionale Inaktivierung von murinem Cyclin E1 sollte durch die gerichtete Deletion einzelner Exons mit essentieller Funktion geschehen. Dies entspricht der artifiziellen Herstellung einer inaktiven Variante von Cyclin E1. Für den Menschen sind solche Cyclin E1-Isoformen als alternative Spleißprodukte hinreichend publiziert worden, während für die Maus bisher kaum Befunde zum Vorkommen und zu Expressionsprofilen von alternativen Spleißprodukten vorliegen. Um die funktionellen Auswirkungen der zu erzeugenden inaktiven Variante von Cyclin E1 abschätzen zu können, war es weiteres Ziel dieser Arbeit, alternative Spleißprodukte von murinem Cyclin E1 zu identifizieren sowie Expressionsprofile und funktionelle Charakterisierungen zu erstellen. Dazu werden transgene Mausmodelle herangezogen, in denen die Proliferation von Hepatozyten durch Überexpression von c-myc und EGF induziert wird. Der Einfluß von Spleißvarianten auf die Tumorigenese kann durch diese Modelle bestimmt werden. Darüber hinaus wird angestrebt, die besondere Rolle von Cyclin E1 bzw. von E1-Spleißvarianten in der Transition aus dem G0-Zustand bzw. aus dem G1-Arrest in den Zellzyklus im Modell der partiellen Hepatektomie zu untersuchen. Die an Wildtyp-Hepatozyten gewonnenen Erkenntnisse sollen später mit Befunden an Mäusen mit Cyclin E1-, Cyclin E2- und E1/E2-Defizienz verglichen werden. Nur auf diese Weise kann eindeutig gezeigt werden, welche Bedeutung die Cycline der E-Familie in der eukaryontischen Zellzyklusregulation insbesondere in murinen Hepatozyten besitzen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	System BM 200/2, Fa. Serva System BM100, Fa. Serva
Bakterieninkubator	BE 600, Fa. Memmert
β-Counter	Radicon, FA. Herfurth
CO ₂ -Inkubatoren	Typ B3 6220, FA. Heraeus Instruments
Corex-Röhrchen	Corex 30 ml, FA. Omnilab
Dewargefäß	Fa. Nalgene
Dispenser	Fa. Eppendorf
Elektroporator	Gene Pulser II, Fa. BIO-RAD
Expositionskassetten	Hypercassette 18 x 24 cm, Fa. Amersham Life Science Hypercassette 35 x 43 cm, Fa. Amersham Life Science
FACS	FACSCalibur, Fa. Becton Dickinson Software Cell Quest 3.1f
Flachbettscanner	Scanmaster, Fa. Microtek
Feinwaage	Fa. Sartorius
Gel-Dokumentation	Gel Doc 100 mit Software, Fa. Bio-RAD Molecular Analyst Version 2.1.2, Fa. Bio-RAD P91Thermoprinter, Fa. Mitsubishi
Geltrockner	Slab Gel Dryer Modell SE 1160 mit Refrigerated Vapor Trap, Fa. Savant und Vakuumpumpe Duo 5, Fa. Pfeiffer
Glaspotter	5 bis 50 ml, Fa. B. Braun Biotech International
Hydrisierungssofen	Typ 400 Hy-E, Fa. Bachofer
Hybridisierungsflasche	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 310, Fa. Applied Biosystems Software Data Collection Version 1.04 Sequence Analysis Version 2.2.1
Kühleinrichtungen	4°C Profi line, Fa. Liebherr Kühlraum -20°C Liebherr comfort Gefrierraum, Fa. Viessman -80°C Gefrierschrank, Typ 6485, Fa. GFL Gefriertruhe, Typ 6374, Fa. GFL Stickstofftank Biosafe MD, Fa. Messer
Kühlzentrifugen	2K15 mit Rotor Nr. 12128, Fa. Sigma 5417R mit Rotor FA45- 24-11, Fa. Eppendorf
Kühlwasserbad	Fa. Julabo
Laborwaage	Fa. Sartorius
Magnetrührer	MR 3001 K, Fa. Omnilab
Mehrkanalpipetten	Transferpette-8, 2,5-25 µl, Fa. Brandt Transferpette-8, 30-300µl, Fa. Brandt

Mikromanipulator	Mikroskop IX70, Fa. Olympus mit Objektkühlung; Transferman, Fa. Eppendorf und CellTram, Fa. Eppendorf
Mikroskope	ITM 2, Fa. Olympus Wilovet S, Fa. Hund
Mikrowelle	Fa. Panasonic
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply PS3002, Fa. Gibco Electrophoresis Power Supply EPS 200, Fa. Pharmacia Biotech
pH-Meßgerät	GPHR 1400 Digital pH/mV-Meter, Fa. LAT
Pipetten	Reference 0,1-10µl, 10-100µl, 50- 200µl, 100-1000µl, 500-2500µl , Fa. Eppendorf
Pipettierhilfe	Akku-Jet, Fa. Brand
Photometer	Lambda Scan 200e, Fa. MWG Biotech Software Lambda KC4 Version #2.7 Rev#9
Reaktionsgefäßschüttler	Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf
Rotationsinkubator	Reax 2, Fa. Heidolph
Röntgenfilmentwickler	Optimax, Fa. Protec Medizintechnik
Semidry-Blotter	Fastblot B44, Fa. Biometra
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel Twin, Fa. Biometra Vertikal-Gelapparatur, 16 x 22 cm, von Fa. Keutz Labortechnik
Schüttler	IKA-Vibrax VXR, Fa. Jahnke und Kunkel
Schüttelinkubator	TH 30, Fa. Edmund Bühler
Spiegelreflexkamera	F70, Fa. Nikon
Stereolupe	SZX 12, Fa. Olympus
Sterilbank	RSB6, Fa. Gelaire Flow Laboratories
Thermocycler	Tpersonal, Fa. Biometra T3 Thermocycler, Fa. Biometra
Tischzentrifugen	5415 D und 5415 C, beides Fa. Eppendorf
Ultraschallstab	Sonoplus
Ultrazentrifuge	Optima LE 80K mit Rotoren SW 28 und Typ 70.1Ti, Fa. Beckman
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800, Fa. Stratagene
Vortexer	Reax 2000, Fa. Omnilab
Wasserbäder	Fa. GFL und Fa. Julabo
Zellzählkammer	Neubauer, Fa. Brandt
Zentrifugen	J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA- 20, Fa. Beckman GS-6R, FA. Beckman Avanti J-25 mit Rotor JA-25.50, Fa. Beckman-Coulter
Zentrifugenbecher	500ml, Fa. Nalgene
Zentrifugenröhrchen	30ml, Fa. Nalgene

4. 2 Mausstämme und transgene Mauslinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hausmaus *Mus musculus* Linnaeus, 1758 als Modellorganismus herangezogen. Adulte Tiere der Inzuchtlinien **129Ola**, **129SV**, **BALB/c**, **C3H**, **C57BL/6** und **DBA/2** (FESTING, 1996) wurden zur Gewinnung von Nukleinsäure- und Proteinextrakten verwendet. Alle Mäuse wurden aus Zuchten des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen.

Vom Jackson Laboratorium, Bar Harbor, USA, wurden Tiere der transgenen Mauslinie **B6;J-TgN (ACTFLPe) 9250Dym** geliefert, die die FLPe-Rekombinase unter Steuerung des humanen β -Actin-Promotors ubiquitär exprimieren (FARLEY et al, 2000; RODRIGUEZ et al, 2000).

Durch die leberspezifische Expression von Onkogenen wurde in zwei Mauslinien im genetischen Hintergrund CD2-F1 (BALB/c x DBA/2) die Bildung von Lebertumoren induziert. Der Mausstamm **EGF-2B** erzeugt eine sekretierbare Form des humanen Epidermal Growth Factors (IgEGF) unter Kontrolle des Albuminpromotors (STERN et al, 1987; TÖNJES et al, 1995; STENZEL, 1997). Im **AAT/c-myc**-Mausstamm steuert der α_1 -Antitrypsinpromotor die Transkription des murinen c-myc-Gens (DALEMANS et al, 1990; RERRAUD et al, 1991).

4. 3 Tierhaltung und Isolation von Lebertumoren aus transgenen Mäusen

Die Tierhaltung der transgenen Mäuse erfolgte im Tierhaus des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und experimentelle Medizin in Hannover in einem für S1-Tierversuche angemeldeten Tierstall in einem 12h Hell-Dunkel-Rhythmus (6.00-18.00 Uhr hell) in sogenannter offener Käfighaltung. Wasser und standardisiertes Haltungsfutter (Fa. Altrumin) standen ad libitum zur Verfügung. Würfe von Jungmäusen wurden im Alter von 3-4 Wochen von der Mutter getrennt und nach Geschlecht sortiert. Zugleich erfolgte unter Ether-Betäubung (Diethylether, Fa. Merck) die Abtrennung von 2-3 mm der noch nicht verknöcherten Schwanzspitze. Die DNA aus dem Schwanzspitzengewebe diente der Genotypisierung der Tiere mittels PCR. Zur Identifizierung wurde jedes Tier nach einem speziellen System mit Ohrlöchern versehen.

Die transgenen Mäuse der Stämme AAT/c-myc und EGF-2B wurden täglich auf ihren Gesundheitszustand überprüft. Sobald ein Tier deutliche Krankheitssymptome aufgrund der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen aufwies (Schwellung des Abdomens, geringe Futteraufnahme, Trägheit, Lethargie, struppiges Fell) wurden es sofort erlöst. Die Tötung erfolgt durch zervikale Dislokation. An die Bestimmung des Gesamtkörpergewichts mittels einer Laborwaage schloß sich die Präparation der Leber an, deren Masse ebenfalls ermittelt wurde. Die einzelnen Lebertumoren wurden dann schnellst möglich isoliert, vermessen, gewogen und eine kurze Beschreibung der äußeren Morphologie angefertigt. Farbdiapositive wurden auf Film der Marke Elite Chrome 400 (Fa. Kodak) hergestellt. In Kryoröhrchen (CryoTube, Fa. Nunc) in flüssigen Stickstoff schockgefroren fand die dauerhafte Konservierung der Tumoren bei -80°C statt.

4. 4 Mikrobielle Arbeitsmethoden

4. 4. 1 Verwendete Bakterienstämme

Chemisch-kompetente Zellen des *Escherichia coli*-Stammes **TOP10F'** (One Shot® TOP 10F', Fa. Invitrogen), die eine Transformationseffizienz von mehr als 1×10^9 Transformatanten pro μg pUC18-DNA aufwiesen, dienten zur Transformation von Ligationsansätzen bzw. zur Retransformation. TOP10F' Zellen enthalten ein F' Episome, das ein Tetracyclinresistenzgen, einen lacI^q -Repressor und einen f1 Replikationsstart umfaßt.

Ultrakompetente *Escherichia coli*-Zellen des Stammes **XL10-Gold** (Fa. Stratagene) wurden zur chemischen Transformation von Plasmiden mit mehr als 10 kb Größe eingesetzt. XL10-Gold Zellen bilden mindestens 5×10^9 Kolonien pro μg transformierter pUC18-DNA.

Genotypen der benutzten *Escherichia coli*-Stämme:

TOP10F'	F' { lacI^q , $\text{Tn10}(\text{Tet}^R)$ } $\text{mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 } \text{recA1 } \text{araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^R) \text{ endA1 nupG}$
XL10-Gold	$\text{Tet}^r \Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F' proAb lacI}^q\Delta\text{M15 Tn (Tet}^r) \text{ Amy Cam}^r]^a$

4. 4. 2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Vermehrung von *Escherichia coli* wurden LB-Medium als flüssige Nährlösung und LB-Agarplatten verwendet.

LB-Medium: 10 g Select Peptone 140 (Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (Fa. Roth) und 10 g NaCl (Fa. Merck) wurden auf 1000 ml mit dest. H_2O aufgefüllt und autoklaviert. Unmittelbar vor Inkulturnahme der Bakterien erfolgte die Zugabe 2 μl Carbenicillin-Lösung pro ml Medium (100 mg Carbenicillin-Natrium/ml, Fa. Serva) zu einer Endkonzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

LB-Agarplatten: 1 Liter LB-Medium wurde mit 15 g Select Agar (Fa. Gibco) versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidpositiver Klone wurde 2 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml Ampicillin-Natrium, Fa. Roth) nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt, so daß eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml Antibiotikum entstand. Nach dem Ausgießen in Petrischalen (10 cm Durchmesser, Fa. Sarstedt) und dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4. 4. 3 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

50 µl chemisch-kompetente Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 10-20 ng zirkulärer Plasmid-DNA bzw. mit 2/3 eines Ligationsansatzes vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 42°C für 30 Sekunden ausgesetzt und danach für 2 Minuten auf Eis abgeschreckt. Der Ansatz wurde mit 200 µl SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Thermoschüttler regeneriert. Jeweils 25 µl, 75 µl und 150 µl des Transformationsansatzes wurde auf einer Agarplatte, welche 2 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden umgedreht über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium: 10 ml SOB-Medium wurden mit 100 µl Mg^{2+} -Lösung und 100 µl 2M Glucose-Lösung supplementiert.

SOB-Medium: 20 g Select Peptone 140 (Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (Fa. Roth), 0,6 g NaCl (Fa. Merck) und 0,19 g KCl (Fa. Applchem) wurden in 1 Liter dest. H_2O gelöst und pH 7,5 eingestellt.

Mg^{2+} -Lösung: 50 % 2M Magnesiumchlorid-Lösung (20,3 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$, Fa. Appli-Chem) in 50 ml dest. H_2O gelöst wurden mit 50 % 2M Magnesiumsulfat-Lösung (24,7 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Fa. Merck) in 50 ml dest. H_2O gelöst) gemischt und steril filtriert.

2M Glucose-Lösung: 54,06 g D-(+)-Glucose (Fa. Sigma) in 100 ml dest. H_2O lösen und steril filtrieren.

Um nach T/A-Ligationsreaktion (siehe 4.6.9) und Transformation in TOP10F'-Zellen eine Unterscheidung zwischen Bakterienkolonien mit nur religiertem Plasmid und Bakterienkolonien mit Insertion im Plasmid zu erleichtern, wurde das Verfahren der **Blau-Weiß-Selektion** angewandt. Hierzu wurden zusätzlich folgende Lösungen benötigt:

40mg/ml X-Gal-Lösung: 400 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal, Fa. Sigma) wurden in 10 ml Dimethylformamid (Fa. ICN Biomedicals) gelöst und bei -20°C gelagert.

100 mM IPTG-Lösung: 238 mg Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG, Fa. Pro-mega) wurden in 10 ml dest. H_2O gelöst, zu je 1 ml aliquottiert und bei -20°C gelagert.

Da TOP10F' Zellen einen Lac-Repressor überexprimieren, mußten die Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion außer mit 40 ml X-Gal-Lösung noch zusätzlich mit 40 ml IPTG vorbehandelt werden. IPTG verdrängte als allosterischer Inhibitor den Lac-Repressor vom Lac-Promotor des Plasmids, der das β-Galaktosidase-Gen steuert. Unter Anwesenheit von IPTG konnte die vom Plasmid kodierte β-Galaktosidase erzeugt werden, die dann X-Gal in eine blaues Indigoderivat umsetzte. Es blieben nur die Bakterienkolonien weiß, in deren Plasmid eine Insertion die Transkription des β-Galaktosidase-Gen unterbunden hatte (lacZ-Mutanten).

4. 4. 4 Verwendete Plasmide

Für Klonierungen und Expressionsstudien wurden nachfolgend aufgeführte Plasmide verwendet. Selbst hergestellte Plasmide werden im Abschnitt "Ergebnisse" beschrieben.

CMVLacZ:	Der Expressionsvektor enthält das β -Galactosidase-Gen unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Er wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt (das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. C. T. Bock zur Verfügung gestellt)
FLPEPURO:	Plasmid zur Expression der FLPe-Rekombinase in Säugerzellen (dieser Vektor wurde freundlicherweise von Dr. H. Hauser, GBF, Braunschweig, zur Verfügung gestellt).
pBluescript-KS I:	Klonierungsvektor mit T3- und T7-Promotor (Fa. Stratagene)
pcDNA4/TO/myc-His C:	Expressionsplasmid (Fa. Invitrogen), das unter Kontrolle eines CMV-Promotors ein Fusionsprotein mit c-terminalem c-myc- und 6xHis-Epitope erzeugt; CMV-Promotor durch 2 Tetracyclin-Operatorsequenzen (TetO ₂) induzierbar; vermittelt Zeocin-Resistenz durch Expression des Bleomycin-Gens aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
pCR2.1:	T/A-Klonierungsvektor mit Polylinkerregion im LacZ-Gen zur Blau-Weiß-Selektion (Fa. Invitrogen)
pEasyFlox:	Basisvektor zur Konstruktion von Gen-Targeting-Vektoren; beinhaltet drei loxP-Erkennungssequenzen, ein Neomycinphosphotransferase-Gen gesteuert vom Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor zur Positivselektion, eine Polylinkerregion sowie ein Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSVTK)-Gen zur Negativselektion (dieser Vektor war eine freundliche Überlassung von Dr. W. Müller, GBF, Braunschweig)
PGKCre:	Plasmid zur Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PGK-Promotors
pTV-0:	Basisvektor zur Konstruktion von Gen-Targeting-Vektoren; enthält ein Neomycinphosphotransferase-Gen unter Kontrolle des HSVTK-Promotors (dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. D. Riethmacher, ZMNH, zur Verfügung gestellt)

4.5 Verwendete Oligonukleotide

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit als Primer für PCR- oder Cycle Sequencing-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide in Bezug auf ihre spezielle Anwendungen aufgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben:

Oligonukleotide für die PCR-Diagnostik der transgenen Mäuse der Linien EGF-2B und AAT/c-myc:

Mauslinie	Name	Sequenz
EGF-2B	Alb-26	GAG CGA GTC TTT CTG CAC ACA CGA TCA CC
	IGEGF	CAT GCG TAT TTG TCC AGA GCT TCG ATG TA
AAT/c-myc	AAT-2016	CAC TGC GAG GGG TTC TGG AGA GGC TTC CG
	CMYC-2724	GGA CAG GGG CGG GGT GGG AAG CAG CTCG

Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung des 3'Bereichs des murinen Cyclin E1-Gens:

Name	Sequenz	Position*
Genom 1 for	TCG GAA AAT CAG ACC ACC CA	4806-4826
Genom 2 for	GTG CAG CAG TCA GAT CTC AGA TGT G	5624-5645
Genom 3 for	CGT TGA GTG ACT TGT AGT GCT TG	6045-6067
Genom 4 for	TAG ATA GGC TCT CAT GTA GCC CAG	6287-6246
Genom 5 for	GAG GAC GTC ATC TAG AAT ACA GGC	6486-6510
Genom 6 for	TGA GTC ACG GTG AAA CCT GTG AAG	6907-6930
Genom 7 for	CTT TAG GCC CTT AAG TGG CGT CTA	8289-8312
Genom 8 for	GTC TGC AAG ATG CCT TGG ATG GAA	9517-9540
GENOM 1 rev	TTG ATA GAC ATA GCA GCA ACT TAC	9862-9884
GENOM 2 rev	AGC ACT TCC ATC CAA GGC ATC TTG	9522-9545
GENOM 3 rev	CAC TCG GAG GAG GAG AAA TCC TAT TC	9298-9323
GENOM 4 rev	TAA GTA CTT GTC TGA TGG GAG GGA G	8922-8946
GENOM 5 rev	GCA AAT CCA AGC TGT TGG AGT GG	8881-8903
GENOM 6 rev	TGA CAC ACT TCT CTA TGT CGC ACC	8757-8780
GENOM 7 rev	CAA GCA GAA GGT CCA CAT ACC TCT	8426-8449
GENOM 8 rev	AGA GGG CTT AGA CGC CAC TTA AG	8295-8320
GENOM 9 rev	GCA AGC GCC ATC TGT AAC ATA AGC	8043-8066
GENOM 10 rev	CTC AAA CTG CCC ATT CTA CCT TAG C	7631-7655
GENOM 11 rev	ATC CCA AGT GGG AAA CCA CTA TGC	7592-7615
GENOM 12 rev	TAG AAC GTC TCT CTG TGG AG	7214-7233
GENOM 13 rev	CAC AGG CCT AGA CTA TGC AGG	5794-5813

*: Die Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Lage in der im Anhang 2 angegebenen Sequenz, die das murine Cyclin E1-Gen sowie 3'- und 5'-gelegenen Sequenzabschnitte enthält (vergleiche NCBI ACCESSION: NT 081350 oder Mouse Genome Sequencing Consortium ACCESSION: CAAA01053590).

Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNAs und zur PCR-Analyse des Expressionsmusters von Cyclin E1 der Maus sowie von GAPDH:

Name	Sequenz	Position
ccne1 I	CAG CTT CGG GTC TGA GTT CCA AGC	1-24 ¹
ccne1 II	TTG ATA GAC ATAGCA GGA CAT GCT G	1745-1768 ¹
ccne1 <i>HindIII</i>	AAG CTT CAG CTT CGG GTC TGA GTT CCA AGC	1-24 ¹
ccne1 <i>NotI</i>	GCG GCC GCT TCT GTC TCC TGC TCG CTG CTG TG	1239-1262 ¹
ccne1 IX	AGA GGG CTT AGA CGC CAC TTA AG	741-763 ¹
Myc-Epitop	TTC GGT ATG CAT ATT CAG ATC CTC	
GAPDH for	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G	758-782 ²
GAPDH rev	AAC ACG GAA GGC CAT GCC AG	974-997 ²

¹: Die Position der Oligonukleotide zur Amplifikation des Cyclin E1-cDNA beziehen sich auf die von Damjanov und Mitarbeitern (DAMJANOV et al, 1994) veröffentlichte Sequenz (NCBI ACCESSION: X75888).

²: Die Primer zur Amplifikation der GAPDH-cDNA wurden aus ROBBINSON und McKINNEY (1992) entnommen.

Oligonukleotide für standardisierte Sequenzierreaktionen:

Name	Sequenz
M13 reverse	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G
M13 forward	GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
BGH reverse	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

Oligonukleotide zur Amplifikation der genomischen Cyclin E1-Abschnitte zur Herstellung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors:

Name	Sequenz	Position*
A plus	TAG GTG TAG AAA GGG ACA CTG AGG	765-779
A minus	TCA GGA CTT GGG CTT GGA ACT CA	1071-1094
B plus	CTC GAG TCG ACG GAC CACA AGC AAC ATG AAA G	1216-1242
B minus	GGC GCG CC TAG TGA GCT CCA GGT CAC CCA AG	3074-3096
C plus	GGC GCG CC TGT ACC AGG CTG GTC TCA AAC TCA	3097-3120
C minus	CTC GAG AGA CCA ATG ACA CTG AGA AGC CAT G	4871-4895
D plus	GTC GAC TTC TGG TCT ACA TTA CTG TGG GTG C	4896-4920
D minus	GTC GAC GAG AAA GGT AAC AGT GGT GAT GCC	5138-5161
E plus	GGA TCC TGT GCT GCT GCA GTC TCT GTG TG	5162-5184
E minus	GGA TCC GAT AGT GAC CGC TGC ACA GCT AG	5571-5593

Sequenzier-Primer:

HSVTK III	GAG AGG CTT TTT GCT TCC TC
Neomycin III	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GA

Die an die Primer angefügten Basen, die zusätzlich Restriktionsschnittstellen an die PCR-Produkte fusionieren, sind fett gedruckt.

*: Die Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Lage in der im Anhang 2 angegebenen Sequenz, die das murine Cyclin E1-Gen sowie 3'- und 5'- gelegenen Sequenz-

abschnitte enthält (vergleiche NCBI ACCESSION: NT 081350 oder Mouse Genome Sequencing Consortium ACCESSION: CAAA01053590).

Oligonukleotide zur Amplifikation der genomischen Cyclin E1-Abschnitte zur Herstellung des 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors:

Name	Sequenz	Position*
Left forward	CGC TGT TGT GGG TAA TTT GCA TGC	3657-3680
Left reverse	AAC TTG TTC TGT AGC CCA GGC TG	6789-6812
Box forward	GTC GAC GAG GCA GAG GCA GGT GGA GCT CTG A	6756-6780
Box reverse	GTC GAC GAA GGT CCA CAT ACC TCT GCG ATC	8420-8443
Right forward	GGA TCC TGC TTG CCC ACT GTG TGT TTG TG	8444-8466
Right reverse	GCG GCC GCC ACA CAC ATT ACT GGC ATG TGT G	11457-11479
Sonde S1 forward	GTG CTA GTA TTG CCA CAG CAA ATC C	11589-11613
Sonde S1 reverse	CAG AAA CAG TCC GCA TGA CCT TAG	12111-12134
Sonde S2 forward	GTT CCA CAA GGT TAC CTA CTA GGC	12508-12531
Sonde S2 reverse	CTG ACC TAC TCT TCA GCA CTG C	12508-12531

Die an die Primer angefügten Basen, die zusätzlich Restriktionsschnittstellen an die PCR-Produkte fusionieren, sind fett gedruckt.

*: Die Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Lage in der im Anhang 2 angegebenen Sequenz, die das murine Cyclin E1-Gen sowie 3'- und 5'-gelegenen Sequenzabschnitte enthält (vergleiche NCBI ACCESSION: NT 081350 oder Mouse Genome Sequencing Consortium ACCESSION: CAAA01053590).

Oligonukleotide zur Amplifikation von Segmenten zur Herstellung einer FRT-flankierten Neomycin-Kassette:

Name	Sequenz
pBackbone 1	TGG ATC CTG AAG TTC CTA TAC TTT CTA GAG AAT BamHI FRT-Erkennungssequenz AGG AAC TTC GAA TTC TAC CGG GTA GGG GAG GCG 5'- Neomycin-Kassette
pBackbone 2	TGG CCG GCC GAA GTT CCT ATT CTC TAG AAA GTA Fse I FRT-Erkennungssequenz TAG GAA CTT CA G CTT CTG ATG GAA TTA GAA CTT GG 3'- Neomycin-Kassette
pBackbone 3	AGT CGA CAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TACGAA SalI loxP-Erkennungssequenz GTT AT T GGC CGG CC G AAG TTC CTA TTC TC FseI FRT-Erkennungssequenz
NcoI forward	CCA CAG TCG ATG AAT CCA GAA AGG C
NcoI reverse	AAG ATG GAT TGC ACG CAG GTT CTC
NeoFlirt Primer I	GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC
NeoFlirt Primer II	CTT AAT ATG CGA AGT GGA CCT CGG
HSVTK III	GAG AGG CTT TTT GCT TCC TC
ARM	CTG CAG CAG CAC AGG ATG CAT AAC

4. 6 **Allgemeine Arbeitsmethoden zur Untersuchung von Nukleinsäuren**

4. 6. 1 **Isolierung genomischer DNA aus Geweben**

Ein murines Gewebestück (z.B. Schwanzspitze oder Lebergewebe) wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in ein Gemisch aus 500 µl Lysepuffer und 25 µl Proteinase K-Lösung (15,6mg/ml, Fa. Roche) überführt und über Nacht bei 50°C und 600 rpm im Thermomixer geschüttelt. Die Proben wurden danach gevortext und bei 14000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Zu 400 µl des Überstandes wurden 560 µl 6M NaCl-Lösung zugefügt und 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die ausgefallenen Proteine bei 14000 rpm für 10 Minuten pelletiert. In 750 µl des Überstandes wurden die Nukleinsäuren mit 700 µl 100%igem Ethanol gefällt und bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Nukleinsäure-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol für eine Stunde geschüttelt, anschließend 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um überschüssige Salze zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet für 5-10 Minuten bei 37°C getrocknet, in 50 µl Rnase/TE resuspendiert und die DNA bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Lyse-Puffer: (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
25 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0	= 50 mM Tris
50 ml 1M NaCl	= 100 mM NaCl
100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0	= 100 mM EDTA
25 ml 20%SDS	= 1% SDS
<hr/>	
TE-Lösung: (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
5 ml 1M Tris-HCl, pH 8,0	= 10mM Tris, pH 8,0
1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	= 1mM EDTA, pH 8,0

0,5M EDTA-Lösung, pH 8,0: 46,5 g EDTA (N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat, Fa. Calbiochem) in 150 ml aufnehmen. Durch Rühren und Einstellen des pH 8,0 mit 1 N NaOH-Lösung (Fa. Merck) lösen und mit dest. H₂O auf 500 ml auffüllen.

1M Tris-HCl, pH 8,0: 60,6 Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. AppliChem) in 400 ml dest. H₂O lösen und den pH 8,0 mit 1 N Salzsäure (Fa. Merck) einstellen, dann auf 500 ml mit dest. H₂O auffüllen.

0,1 mg/ml RNase/TE: 10 mg Rnase A (Fa. Sigma) in 100 ml TE lösen.

6M NaCl-Lösung: 174 mg NaCl (Fa. Merck) in 500 ml dest. H₂O lösen.

20% (w/v) SDS-Lösung: 100 g Natrium-Dodecylsulfat (Fa. Sigma) in 500 ml dest. H₂O lösen.

4. 6. 2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Analytische Plasmidpräparation (Mini-Präparation)

Mit dieser Methode wurde DNA aus kleinen Bakterienkulturen (4 ml) isoliert, um schnell einzelne, transformierte Bakterienklone durch nachfolgenden Restriktionsverdau der präparierten Plasmid-DNA schnell überprüfen zu können. Der Reinheitsgrad der DNA war für Sequenzanalysen allerdings nicht ausreichend.

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Bis auf einen geringen Rest wurde der Überstand dekantiert und das Pellet resuspendiert. Dann wurden 300 µl TENS-Puffer zugegeben und die Suspension 5 Sekunden gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur zur alkalischen Lyse der Bakterien inkubiert (BIRNBOIM und DOLY, 1979). Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2, woraufhin die Proben 5 Sekunden gevortext und bei -20°C für 20 Minuten zur Fällung der Proteine und chromosomaler DNA gekühlt wurden. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 x g und Raumtemperatur wurden die milchig-weißlichen Präzipitate pelletiert. In einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 450 µl des Überstandes rasch mit 900 µl eiskaltem 100%igem Ethanol (Fa. T.J.Baker) vermischt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 x g und 4°C pelletiert und anschließend zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (siehe oben) wurde der Überstand abgenommen, die Plasmide ca. 20 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 50 µl Rnase/TE-Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Die erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

TENS-Puffer: (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0	= 10mM Tris-HCl, pH 8,0
1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	= 1mM EDTA, pH 8,0
5ml 10N NaOH	= 0,1N NaOH
12,5 ml 20% SDS	= 0,5% SDS

Präparation hochreiner Plasmid-DNA

Um sehr reine Plasmid-DNA für Sequenzanalysen zu erhalten, wurde DNA aus kleinen Bakterienkulturen (4 ml) mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) isoliert, wobei die Herstellerangaben strikt befolgt wurden. Eine Analyse von Integrität und gegebenenfalls Insertgröße des Plasmid fand durch Restriktionsspaltung und Agarosegelelektrophorese statt (siehe 4.6.6 und 4.6.9). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 4.6.5). Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Präparative Plasmidpräparation (Maxi-Präparation)

Präparative Plasmidpräparationen wurden mit den Plasmid Maxi Kit sowie dem EndoFree Buffer Set der Firma Qiagen nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers zur endotoxinfreien DNA-Präparation durchgeführt. Die Verwendung endotoxinfreier DNA erhöht bei Transfektionsexperimenten die Effizienz des Transfers erheblich. Die Ausbeute an Plasmid-DNA aus einer 250 ml Übernachtskultur liegt bei

diesen Aufarbeitungsmethoden zwischen 100-500 µg. Eine Analyse von Integrität und gegebenenfalls Insertionsgröße des Plasmid fand durch Restriktionsspaltung und Agarosegelelektrophorese statt (siehe 4.6.6 und 4.6.9). Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe 4.6.5). Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

4. 6. 3 Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen

Die Gewinnung von Gesamt-RNA (rRNA, tRNA und mRNA) aus Mauslebern erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Fa. Qiagen). Unter Rnase-freien Bedingungen wurden 30 mg des bei -80°C tiefgefrorenen Lebergewebes in 600 µl RLT-Puffer (10 µl/ml 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit einem Ultraschallstab homogenisiert. Auch wurde Gesamt-RNA aus Zellen, die in 6 cm-Schalen kultiviert worden waren, extrahiert. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 3 ml PBS erfolgte das Abschaben der Zellen in 600 µl 2-Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer mittels Zellschaber. Die Zellsuspension wurde dann in QIAshredder-Säulen (Fa. Qiagen) pipettiert und durch Zentrifugation bei 10000 x g für 2 Minuten homogenisiert.

Anschließend wurde das Homogenat aus Gewebe oder Zellen bei 4°C für 5 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß erfolgte sofort die Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe auf eine silica-gel based membrane (Herstellerangabe) aufgetragen und bei 8000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten der Membran konnte die RNA in einem minimalen Volumen von 30 µl DEPC-H₂O eluiert werden. Laut Hersteller waren Ausbeuten von 40 µg bzw. 35 µg Gesamt-RNA pro 10 mg Leber- bzw. Milzgewebe und 15 µg Gesamt-RNA aus 1 x 10⁶ Huh7-Zellen zu erwarten. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch (siehe 4.6.5).

DEPC-H₂O: 2 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, Fa. Sigma) wurden zu 1 Liter dest. H₂O geben, geschüttelt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

4. 6. 4 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren

Natriumacetat-Ethanol-Fällung:

Die DNA wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 sowie 2 Volumina 100%igem Ethanol gefällt, wobei die Präzipitation für mindestens 30 Minuten bei -20°C erfolgte. Bei geringen DNA-Mengen wurde 1 µg Glycogen als Präzipitationshilfe zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 20 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die pelletierte DNA mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15000 x g, 4°C, 10 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet ca. 10-15 Minuten getrocknet und in dest. H₂O aufgenommen.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung:

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-haltigen Reaktionsansätzen wurden die entsprechenden Proben phenolisiert und die DNA anschließend präzipitiert.

Zu diesem Zweck wurden die wäßrigen DNA-Proben mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Fa. Roth) versetzt, gründlich gevortext und zur Phasentrennung 2 Minuten bei 15000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und der Phenolisierungsvorgang noch zweimal wiederholt. Die DNA in der letzten wässrigen Phase wurde mit Ethanol präzipitiert.

4. 6. 5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm in UV-Platten (UV 96 Well Flat Bottom, Fa. Costar) im Photometer Lambda Scan 200e (Fa. MWG Biotech) gemessen. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1,0 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung konnte bei zusätzlicher Messung der Extinktion bei 280 nm getroffen werden. Der Quotient E_{260}/E_{280} liegt bei geringen Verunreinigungen von DNA bei 1,7-1,9 und für RNA zwischen 1,9-2,1.

4. 6. 6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die zu spaltende DNA wurde mit mindestens 3 units Enzym/µg DNA mindest 1 Stunde behandelt. Bei Bedarf schloß sich eine 20minütige Inaktivierung bei 65°C an.

4. 6. 7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die betreffende Bande ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte bei DNA-Fragmenten bis zu 10 KB mittels des Gel Extraction Kits (Fa. Qiagen). oder MinElute Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen). Unter Verwendung des Qiaex II Kits (Fa. Qiagen) wurden DNA-Fragmente über 10 KB Größe extrahiert, wobei jeweils das Herstellerprotokoll ohne Abweichung befolgt wurde. Eine Analyse auf Integrität und Quantität der extrahierten Fragmente fand durch Agarosegelelektrophorese statt (siehe 4.6.9). Die DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

4. 6. 8 Ligation von DNA

Die Ligationstechnik dient der Verknüpfung homolog-kohäsiver (*sticky ends*) bzw. stumpfer Enden (*blunt ends*) von DNA-Fragmenten. Die hierzu notwendige DNA-Ligase ist in eukaryontischen Zellen ein wichtiges Reparaturenzym für aufgebrochene Phosphodiesterbindungen in der DNA. Bei Klonierungsexperimenten kann diese Eigenschaft des Enzyms dazu genutzt werden, DNA-Moleküle *in vitro* miteinander zu verknüpfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Ligationen mit T4-DNA-Ligase und dem zugehörigen Puffers der Fa. NEB unter Zusatz von 1 µl 10 mM ATP (Fa. Sigma) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Die Ligation kohäsiver Enden erfolgte unter Zusatz von 200 Weiss-U T4-DNA-Ligase durch eine mindestens dreistündige Inkubation bei 16°C. Bei kohäsiven Ligationen wurden der linearisierte Vektor und das zu ligierende Insert in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt, wobei eine DNA-Gesamtmenge von 500 ng bei kohäsiven Ligationen angestrebt wurde.

T/A- Klonierung

PCR-Produkte (siehe 4.7.1) weisen 3'-Adenosin-Überhänge auf, die direkt an modifizierte Thymidin-Überhänge linearisierter Vektoren ligiert werden können (T/A-Klonierung). In dieser Arbeit wurde dazu der TOPO T/A Cloning Kit (Fa. Invitrogen) eingesetzt, der das modifizierte Plasmid pCR 2.1 enthält. Zur Klonierung wurden 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂) und 1 µl Plasmidsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. PCR-Produkte mit einer Größe bis 500 bp wurde für 5 Minuten inkubiert, während für größere PCR-Produkte die Inkubationszeit bis auf 30 Minuten verlängert wurde.

4. 6. 9 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten. Da sich diese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegen, lassen sie sich mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix ihrer Größe entsprechend auftrennen. Durch Ethidiumbromidfärbung können Nukleinsäurefragmente visualisiert werden, da Ethidiumbromid die DNA interkaliert. Bei Betrachtung unter UV-Licht (254 nm oder 366 nm) fluoresziert das Ethidiumbromid intensiv orange. Sowohl für analytische als auch für präparative Agarosegelelektrophoresen wurden 0,8ige - 3%ige Gele in TAE-Puffer mit 0,0001 Vol. Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Fa. Sigma) eingesetzt. Zur Herstellung 0,8%ige– 2%iger Gele wurde die Electrophoresis Grade Agarose (Fa. Invitrogen) und für 3%ige Gele die Amplisize Agarose (Fa. BIO-RAD) verwandt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,2 Volumen 5 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TAE als Laufpuffer. Als DNA-Größenstandards wurden die 100 bp DNA-Leiter (Fa. Gibco) und die 1 KB Plus DNA-Leiter (Fa. Gibco) eingesetzt.

50x TAE-Stammlösung: (add 1Liter)	Endkonzentration
242 g Tris	= 2 M Tris
57,1 ml Essigsäure (Fa. Merck)	= 5,7 % (v/v) Essigsäure
100ml 0,5M EDTA, pH 8,0	= 50 mM EDTA
Aus dieser Stammlösung wurde die 1x Gebrauchslösung hergestellt.	
5x DNA-Ladepuffer: (add 100 ml)	Endkonzentration
50 mg Bromphenolblau-Natrium (Fa. Serva)	= 0,05% (w/v) Bromphenolblau
50 mg Xylencyanol (Fa. Merck)	= 0,05% (w/v) Xylencyanol
34 ml 100% Glycerol (Fa. Serva)	= 30% Glycerol
20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	= 0,1 M EDTA

4. 7 Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen

4. 7. 1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das grundlegende Prinzip der PCR-Methode ist die vielfache Wiederholung eines Teilschritts, bei der eine Kopie der beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge synthetisiert wird. Da jeder Reaktionsschritt neue identische Matrizen-DNA erzeugt, steigt die Kopienzahl entsprechend einer Kettenreaktion exponentiell an (SAIKI et al, 1988).

Die in einzelnen Versuchsteilen verwendeten Oligonukleotide (Fa. MWG Biotech und Fa. Operon) und deren Anwendung wurden bereits in Kapitel 4.5 spezifiziert. Als Reaktionsgefäße dienten 8-PCR-Strips (0,2 ml Softstrips, Fa. Biozym) oder 0,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf). Bestimmt durch die unterschiedlichen experimentellen Anforderungen wurden zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente in dieser Arbeit drei unterschiedliche PCR-Systeme eingesetzt.

Bei der Genotypisierung von Mäusen kam der Taq PCR Mastermix Kit (Fa. Qiagen) zum Einsatz. Der Taq PCR Mastermix enthielt 5 units/ μ l modifizierte, recombinante *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, 400 mM von jedem Nukleosidtriphosphat (dNTP) und PCR-Puffer (mit 3 mM $MgCl_2$). Standartisiert wurde jeweils 1 μ l genomischer DNA als Matrize (template) eingesetzt (siehe 4.3 und 4.6.1). Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

Reaktionslösung	Volumen	Endkonzentration
Taq PCR Mastermix (2 x)	12,5 μ l	1,25 units Taq, 1 x PCR-Puffer; 100 μ M von jedem dNTP
Forward Primer (10 pmol)	1 μ l	10 pmol
Reverse Primer (10 pmol)	1 μ l	10 pmol
template	1 μ l	x ng
dest. H_2O	9,5 μ l	
Gesamtvolumen	25 μ l	

Folgendes Standardprogramm wurde für die jeweilige Primerkonstellation und DNA-Matrize modifiziert:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	94°C	2 Minuten		
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden		
3. Annealing	T _m - 5°C	15 –30 Sekunden		
4. Elongation	72°C	1 Minute	2.	30
5. Elongation	72°C	2 Minuten		
6. Konservierung	4°C	Pause		

Bei 72°C Elongationstemperatur erzeugt die Qiagen Taq-Polymerase 2-4 KB DNA pro Minute. Das Standard-Programm wurde bezüglich der Annealing-Temperatur je nach den errechneten Schmelzpunkten (T_m) für jedes Primerpaar modifiziert. Maximal wurde die Annealing-Temperatur um 5°C geringer gewählt als die Schmelztemperatur der Primer bei kurzer Annealing-Zeit von 15 Sekunden. Traten dabei zu viele unspezifische PCR-Produkte auf, erfolgte die schrittweise Erhöhung der Annealing-Temperatur bis zur Schmelztemperatur der Primer bei gleichzeitiger Verlängerung des Annealing bis auf eine Minute. Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern erfolgte nach der Formel: $T_M = 2^\circ\text{C} \times (\text{AT}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{GC})$. Ansonsten wurden die Angaben der Oligonukleotid-Hersteller beachtet. Die PCR-Produkte wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.6.9) identifiziert.

Alle weiteren PCR-Reaktionen, die keine besondere Genauigkeit der template-Wiedergabe erforderten, wurden mit dem HotStarTaq Mastermix Kit (Fa. Qiagen) ausgeführt. Dieser verbindet die Vorteile des nahezu einsatzfähigen Mastermixes mit dem Hot Start-Prinzip. Die Polymerase wird erst nach einer langen Denaturierungsphase von 15 Minuten bei 95°C aktiv, so daß sich unspezifische Anlagerungen der Primer während der Herstellung der Reaktionsansätze nicht in Form unspezifischer PCR-Produkte auswirken können. Der HotStarTaq Mastermix enthielt 5 units/µl modifizierte, rekombinante *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, 400 mM von jedem Nukleosidtriphosphat und PCR-Puffer (mit 3 mM MgCl₂). Die Reaktionsansätze wurden wie folgt erstellt:

Reaktionslösung	Volumen	Endkonzentration
HotStarTaq PCR Mastermix (2 x)	12,5 µl	1,25 units Taq, 1 x PCR-Puffer; 100 µM von jedem dNTP
Forward Primer (10 pmol)	1 µl	10 pmol
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl	10 pmol
template	1 µl	x ng
dest. H ₂ O	9,5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

Folgendes Standardprogramm wurde für die jeweilige Primerkonstellation und DNA-Matrize modifiziert:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	15 Minuten		
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden		
3. Annealing	T _m - 5°C	15–30 Sekunden		
4. Elongation	72°C	1 Minute/KB	2.	25-35
5. Elongation	72°C	2 Minuten/KB		
6. Konservierung	4°C	Pause		

Die Qiagen HotStarTaq-Polymerase produzierte bei 72°C Elongationtemperatur 2-4 KB DNA pro Minute. Bei problematischen PCR-Reaktionen ohne Produkt oder mit großer Menge unspezifischer Produkte wurde dem Reaktionsgemisch 2,5 µl 10 x Q-Solution (Fa. Qiagen) oder 2-8% (v/v) DMSO (Fa. Stratagene) zur Optimierung zugesetzt. Die PCR-Produkte wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.6.9) und gegebenenfalls T/A-Klonierung (siehe 4.6.8) und Sequenzanalyse (siehe 4.7.6) identifiziert.

Optimierung von ineffizienten PCR-Reaktionen fand zudem durch sogenannte „Touchdown“-Programme statt, die in den ersten 10 Zyklen durch ein Temperatur-Inkrement die optimale Annealing-Temperatur zu treffen versuchen, so daß ein Basismenge des gesuchten PCR-Produkts entsteht. Dann folgen 25 Zyklen mit der als optimal errechneten Annealing-Temperatur zur Amplifikation der Basismenge des spezifischen DNA-Abschnitts. Folgendes Programm diente als Grundlage für Touchdown-PCRs:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	15 Minuten		
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden		
3. Annealing	T _m +2°C	30 Sekunden	-1°C je Zyklus	
4. Elongation	72°C	30 Sekunden/KB	2.	10
5. Denaturierung	95°C	15 Sekunden		
6. Annealing	T _m - 5°C	15 Sekunden		
7. Elongation	72°C	30 Sekunden/KB	5.	25
8. Elongation	72°C	2 Minuten		
9. Konservierung	4°C	Pause		

War hohe Genauigkeit der DNA-Kopien notwendig, wurde auf die HerculaseTM Enhanced DNA Polymerase (Fa. Stratagene) mit Proofreading-Funktion zurück gegriffen. Diese HerculaseTM Enhanced DNA Polymerase stellt ein Gemisch aus Pfu DNA Polymerase, PfuTurbo® PCR enhancing factor und Taq 2000TM DNA Polymerase dar. Proofreading-Polymerasen besitzen eine 3'-5'-Exonuklease-Funktion, die fehlgepaarte Nukleotide entfernt und so eine deutlich geringere Fehlerrate besitzen als herkömmliche Taq-Polymerasen. Folgender Reaktionsansatz wurde benutzt:

Reaktionslösung	Volumen	Endkonzentration
Herculase Enhanced DNA Polymerase	0,5 µl	1 unit
10 x Herculase Puffer	5 µl	1x
Forward Primer (10 pmol)	3 µl	30 pmol
Reverse Primer (10 pmol)	3 µl	30 pmol
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	4 µl	jeweils 200 µM
template	x µl	
dest. H ₂ O	x µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Der dNTP-Mix wurde von der Fa. Promega bezogen. Herculase Enhanced DNA Polymerase synthetisiert 1 KB DNA pro Minute. Als template wurden 15-60 ng Plasmid oder 100-250 ng genomische DNA eingesetzt. Optimierung der PCR-Reaktion fand auch hier durch Zugabe von DMSO, Veränderung der Annealing-Bedingungen oder durch Touchdown-Programme statt (siehe oben). Folgendes Standardprogramm wurde für die jeweilige Primerkonstellation und DNA-Matrize modifiziert:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	98°C	3 Minuten		
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden		
3. Annealing	T _m - 5°C	15–30 Sekunden		
4. Elongation	72°C	1 Minute/KB	2.	25-35
5. Elongation	72°C	2 Minuten/KB		
6. Konservierung	4°C	Pause		

Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.6.9) und gegebenenfalls T/A-Klonierung (siehe 4.6.8) und Sequenzanalyse (siehe 4.7.6) identifiziert. Die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Proofreading-Polymerase entfernt die zur T/A-Klonierung essentiellen terminalen 3'-Adenosin-Überhänge der Amplifikate. Zur Wiederherstellung der Adenosin-Überhänge wurde am Ende des PCR-Programms jedem Reaktionsansatz 1 µl Taq PCR Mastermix zugefügt und eine 10-minütige Elongation bei 72°C durchgeführt.

4. 7. 2 Reverse Transkription (RT) und RT-PCR

In vitro kann reife mRNA als Matrize für die Herstellung einer genauen DNA-Kopie - copy DNA oder cDNA genannt – dienen. An einem DNA-Primer beginnend synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase, eine in Retroviren identifizierte RNA-abhängigen DNA-Polymerase, eine identischen DNA-Kopie der RNA (TAYLOR, ILLMENSEE und SUMMERS, 1976; BERCHTHOLD, 1989). Dieses Verfahren der Reversen Transkription kann in Verbindung mit der PCR zur Analyse der Expressionsmuster bestimmter Gene eingesetzt werden. cDNAs dienen zudem der Erzeugung rekombinanter Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die Omniscript Reverse Transcriptase (Fa. Qiagen) mit Oligo-dT 15 Primer (Fa. Promega) benutzt. Durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern, die sich an die 3' terminale Poly(A)-Sequenz der reifen mRNA anlagern, wurde

die Kopierung der vollständigen mRNA gewährleistet. Pro Reaktionsansatz hat sich der Einsatz von 2 µg Gesamt-RNA bewährt. Folgendes Reaktionsgemisch wurde hergestellt:

Reaktionslösung	Volumen	Endkonzentration
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 units
10 x Puffer RT	5 µl	1 x
Oligo-dT 15 Primer (0,5µg/µl)	4 µl	2 µg
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	4 µl	jeweils 500 µM
Gesamt-RNA	x µl	2 µg
DEPC-H ₂ O	x µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Die DNA-Synthese fand in 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler statt, woran sich die Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 73°C für 10 Minuten und die Konservierung bei 4°C anschlossen. Folgte außerdem eine PCR-Reaktion mit den synthetisierten cDNAs als template, spricht man von einer Zweischnitt-RT-PCR. Durch PCR mit spezifischen Primern für die cDNA des ubiquitär exprimierten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gens aus der Glykolyse wurde zuerst die Integrität des cDNA-Gemisches bewiesen (Housekeeping-Gen). Zugleich diente das GAPDH-Signal zur Bestätigung des Einsatzes gleicher Gesamt-RNA-Mengen in der RT-Reaktion und somit als Abgleich für die folgenden PCR-Experimente.

4. 7. 3 Southern Blot

Southern Blotting ist ein Verfahren zum Transfer von DNA aus dem Agarosegel auf eine Membran zur Immobilisierung. Im Anschluß an die Restriktionspaltung von genomischer DNA und die Agarosegelelektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in 0,25 N HCl-Lösung geschwenkt, bis die untere, dunkelblaue Bande des Ladepuffers sich gelb gefärbt hatte. Dieser Depurinierungsschritt spaltete lange DNA-Fragmente durch Strangbrüche in kürzere Abschnitte ohne deren Position im Gel zu verändern, was den Transfer der DNA stark erleichtert. Anschließend wurden durch Schwenken in Denaturierungslösung (50% 1N NaOH/ 50% 3M NaCl) für 20 Minuten DNA-Einzelstränge erzeugt und das Agarosegel zugleich neutralisiert. Es folgte der Aufbau des Kapillar-Blots. Eine rechteckige Plastikwanne wurde mit 2 Litern 20x SSC gefüllt und eine Glasplatte darüber gelegt. Ein Streifen Filterpapier (Chromatography Paper 17 CHR, Fa. Whatman), der die Breite des zu blottenden Gels hatte, wurde mit 20x SSC befeuchtet und so auf die Glasplatte gelegt, daß er an beiden Seiten tief in die Salzlösung eintauchte. Umgedreht wurde das Gel auf dieses Filterpapier gelegt und luftblasenfrei mit einer passenden Nylonmembrane (Hybond-N+, Fa. Amersham Bioscience) bedeckt. Auf die Membran folgte ein mit der Denaturierungslösung angefeuchtetes Filterpapier, ein Stapel saugfähigen Zellstoffs (Nowozell natur, 4-lagig), eine Glasplatte und ein Gewicht zur Beschwerung. Durch die Kapillarwirkung des Zellstoffs wurden mit dem 20x SSC auch die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen. Das Blotting fand über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert und diese getrocknet. Anschließend erfolgte

das Crosslinking der DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (1200 Watt, Stratalinker, Fa. Stratagene).

20x SSC, pH 7,0: (add 1 Liter)	Endkonzentration
175,3 g NaCl (Fa. Merck)	= 3M Natriumchlorid
88,2 g Natriumcitrat-2-hydrat (Fa. J.T. Baker)	= 0,3M Natriumcitrat
pH 7,0 mit 1 M HCL einstellen	

4. 7. 4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ^{32}P

Radioaktive Phosphatgruppen wurden mittels des Nick-Translation Kit N 5000 (Fa. Amersham Bioscience) in DNA-Sonden von 500-1000 bp Größe eingebaut. Das Markierungsprinzip dieses Kits beruht auf der Tatsache, daß die DNase I in zufälliger Abfolge DNA-Doppelstrangbrüche verursacht. Diese Bruchstellen werden von der DNA Polymerase I verschlossen, in dem das Nukleotid am 5' Ende der Bruchstelle entfernt (5'-3'-Exonuklease-Funktion) und der Doppelstrang anschließend durch den Einbau eines radioaktiven ^{32}P - α dCTP-Moleküls geschlossen wird (5'-3'-DNA-Polymerase-Funktion) (RIGBY et al, 1977). Aus dieser Reaktion entsteht eine einheitliche Population radioaktiv markierter DNA-Moleküle gleicher Größe.

Pro Reaktionsansatz wurde vom Hersteller empfohlen 50 ng DNA, 5 μl Enzymlösung, 10 μl Nukleotid-Puffer und 5 μl ^{32}P - α dCTP (10 $\mu\text{Ci/ml}$, Fa. Amersham) mit dest. H_2O auf ein Volumen von 50 μl einzustellen und die Labelling-Reaktion bei 16°C für 2 Stunden ablaufen zu lassen. Nach Zugabe von 5 μl 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0 wurden die überschüssigen Radionukleotide durch Gelfiltration in Resin-Säulen (Microspin S-200 HR Columns, Fa. Amersham Bioscience) von der radioaktiven Sonde abgetrennt.

4. 7. 5 Hybridisierung mit radioaktiven Sonden

Für radioaktive Hybridisierungen wurden folgende Puffer und Lösungen hergestellt:

Church-Hybridisierungslösung: (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
250 ml 1M Na_2HPO_4 , pH 9,0	= 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,2
60 ml 1M NaH_2PO_4 , pH 3,8	
1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	= 1mM EDTA
175 ml 20% SDS	= 7% SDS

1M NaH_2PO_4 -Lösung: 69 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck) wurden in 500 ml dest. H_2O gelöst und der pH 3,8 mit 85% H_3PO_4 (Fa. Merck) eingestellt.

1M Na_2HPO_4 -Lösung: 89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck) und pH 9,0 mit 1 M NaOH eingestellt.

5x SSC, 0,1% SDS: (add 1 Liter)	Endkonzentration
250 ml 20x SSC	= 5x SSC
5 ml 20% SDS	= 0,1% SDS

2x SSC, 0,1% SDS:(add 1 Liter) Endkonzentration

100 ml 20x SSC	= 2x SSC
5 ml 20% SDS	= 0,1% SDS

0,1x SSC, 0,1% SDS:(add 1 Liter) Endkonzentration

5 ml 20x SSC	= 0,1x SSC
5 ml 20% SDS	= 0,1% SDS

Die zu markierende Southern-Membran wurde mit 2x SSC, 0,1% SDS-Lösung angefeuchtet und luftblasenfrei an die innere Wand einer Hybridisierungsflasche gelegt, in die dann 8 ml 65°C warme Church-Hybridisierungslösung pipettiert wurden. Unter ständigem Drehen im Hybridisierungssofen bei 65°C dauerte die Prähybridisierung mindestens 1 Stunde. Die radioaktive DNA-Sonde wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten und durch Abschrecken auf Eis denaturiert, auf die prähybridisierte Membran gegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Tag fand die Entfernung unspezifisch gebundener Sonde durch Waschen bei 65°C in Hybridisierungsflaschen mit 5x SSC, 0,1% SDS- und 0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung statt. Die Membran wurde anschließend in eine Kunststoffolie eingeschweißt und in eine Expositionskassette überführt, in der die Detektion der radioaktiven Signale auf Röntgenfilm (Kodak X-Omat, 35 x 43cm, Fa. Sigma und Hyperfilm, 18 x 24, Fa. Amersham Life Science) bei -80°C erfolgte.

Um die gleiche Membran mit einer zweiten radioaktiven Sonde hybridisieren zu können, mußte die vorherige Sonde durch Erhitzen und Schwenken der Membran im Schüttelwasserbad bei 95°C in 0,1% SDS-Lösung für 1 Stunde entfernt werden. Die neuerliche Hybridisierung lief danach wie oben beschrieben ab.

4. 7. 6 Sequenzierung von DNA

Die hier angewandte moderne Sequenzanalyse basiert auf der modifizierter Form der Sanger-Methode (SANGER, NICKLEN und COULSEN, 1977) im Verbund mit einem computergesteuerten Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssystem.

In der sogenannten Cycle Sequencing-Reaktion wird eine doppelsträngige DNA als Matrize einer PCR-Reaktion eingesetzt, die mit nur einem, für den zu analysierenden DNA-Abschnitt spezifischem Oligonukleotid, dem BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Fa. Applied Biosystems) und 500-700 ng doppelsträngiger DNA durchgeführt wird. Der BigDye Terminator Ready Reaction Mix setzt sich aus einer AmpliTaq DNA Polymerase FS (modifizierte Taq DNA Polymerase zum Einbau von Didesoxynukleotiden), Tris-HCl-Puffer, MgCl₂, Desoxynukleotiden und Didesoxynukleotiden zusammen. Die einzelnen Didesoxynukleotide sind jeweils an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (Dichlororhodamine) gekoppelt.

Die Cycle Sequencing Reaktion beruht auf dem Prinzip, daß durch den Einbau eines Didesoxynukleotids ein Abbruch der Kettenverlängerung eintritt. In jedem Zyklus der Reaktion entsteht somit eine statistische Verteilung von PCR-Produkten, deren differierende Längen vom Einbau eines terminierenden Didesoxynukleotids definiert sind und zugleich einer spezifische Farbstoffmarkierung entsprechen. Trennt man das

endgültige Gemisch elektrophoretisch auf, so erhält man Fraktionen, die sich im Idealfall jeweils um genau 1 Base in der Länge und zugleich in ihrer Farbstoffmarkierung eindeutig unterscheiden.

Zur Detektion dieser Fraktionen und ihrer Farbstoffkopplung wurde das Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssystem ABI Prism 310 benutzt. Durch eine Glaskapillare (310 Kapillare 47 cm, grün, Fa. Applied Biosystems) gefüllt mit einem denaturierenden Polymer (POP-6 Polymer, Fa. Applied Biosystems) und 1x Elektrophoresepuffer (10 x Puffer (mit EDTA), Fa. Applied Biosystems) wandern DNA-Einzelstränge nach Größen getrennt bei 15KV-Elektrophoresespannung. An einer bestimmten Position trifft der Lichtstrahl eines Argon-Lasers auf die Kapillare. Durch den Laserstrahl angeregt, imitieren die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe an den Enden der wandernden DNA-Fragmente Licht unterschiedlicher Wellenlänge, das über Spiegel und Prisma abgelenkt von einer CCD-Kamera detektiert wird. Spezielle Software errechnet aus den gewonnen Daten eine Abfolge von Spitzen bestimmter Lichtwellenlänge, die die Basensequenz des DNA-Abschnitts repräsentiert.

Folgende Cycle Sequencing-Reaktionslösungen wurden hergestellt:

Reaktionslösung

BigDye Terminator Ready Reaction Mix	3 µl
Primer (5 pmol)	1µl
template	x µl
HPLC-Wasser (Fa. J.T.Baker)	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Das standardisierte Cycle Sequencing-Programm steuerte folgenden Ablauf:

Vorgang	Temperatur	Zeit	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	96°C	30 Sekunden		
2. Annealing	T _m – 5°C	30 Sekunden		
3. Elongation	60°C	4 Minuten	1	24
4. Konservierung	4°C	Pause		

Die Aufarbeitung der Sequenzreaktionen fand durch ein Gelfiltrationssystem (Dye Ex 2.0 Spin Kit, Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers statt. Das resultierende Eluat wurde in gerätespezifische Gefäße überführt und mit einem entsprechenden Septum verschlossen (Genetic Analyzer Sample Tubes, 0,5 ml und Septa, Fa. Applied Biosystems).

4. 8 Arbeitsmethoden zur Charakterisierung von Proteinen

4. 8. 1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Um vergleichbare Bedingungen für Proteinassays zu schaffen, wurden 5×10^5 Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen mit 3 ml Medium ausgesät. Entsprechend der experimentellen Fragestellung schlossen sich unterschiedliche Behandlungsschritte an.

Alle folgenden Schritte zur Ernte und Präparation von Gesamtzellextrakten fanden auf Eis bzw. gekühlt statt, um die Degradation der Proteine zu minimieren. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. In 200 µl NP-40-Puffer fand die Lyse der Zellen bei 4°C für 10 Minuten unter ständigem Schütteln statt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in dem Zelldebris durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C in 5 Minuten pelletiert wurde. Nach Überführung der Überstände in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße folgte die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (siehe 4.8.2). Es schloß sich die Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE (siehe 4.8.3) an. Die Proteinlysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

NP-40-Puffer: (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5	= 50 mM Tris-HCl
15 ml 5 M NaCl	= 150 mM NaCl
2,5 ml Nonidet P-40 (NP-40, Fa, Sigma)	= 0,5% (v/v) NP-40
1,05 g Natriumfluorid (Fa.Merck)	= 50 mM NaF
frisch zuzufügen (add 10 ml):	
100 µl 100 mM Natriumvanadat	= 1 mM NaVO ₃
10 µl 1 M DTT	= 1 mM DTT
100 µl 100 mM PMSF-Lösung	= 1 mM PMSF
1 Complete Mini Tablette (Protease-Inhibitor-Cocktail, Fa. Roche)	

1 M DTT-Lösung: 1,54 g DTT (Fa. Sigma) wurden in 10 ml dest. H₂O gelöst und in 1 ml- Aliquots bei –20°C gelagert.

100 mM PMSF-Lösung: 174 mg PMSF (Fa. Sigma) wurden in 10 ml 100%igem Isopropanol gelöst und in 1 ml-Aliquots bei –20°C gelagert.

100 mM Natriumvanadat-Lösung: 122 mg NaVO₃ (Fa. Merck) wurden in 10 ml dest. H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

4. 8. 2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine erfolgt (BRADFORD et al, 1976). Die Proteinkonzentrationen der Extrakte aus Zellkultur wurden durch dieses Verfahren ermittelt. 3 µl der Extrakte wurden mit 797 µl Wasser vermischt und mit 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. BIO-RAD) versetzt. Die Proben wurden mit dem Vortexer gut durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blaufärbung der Probe wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe (1-20 µg) berechnet.

4. 8. 3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine werden in SDS-Probenpuffer denaturiert und in Polyanionen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Elektrophorese in denaturierenden SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte (LAEMMLI, 1970). Sie werden durch Coomassie-Färbung oder Western Blot als Proteinbanden dargestellt. Die Größe der Proteine wird im Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsstandard bestimmt.

10 µg Proteinlösung wurden mit H₂O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 5 x Probenauftragspuffer versetzt und bei 95°C 10 Minuten aufgeköcht. Die Ansätze sowie 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, Fa. BIO-RAD) wurden auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA solange, bis die blaue Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte. Folgende Verbindungen und Lösungen wurden benötigt:

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Fa. Sigma

Rotiphorese Gel 30, Fa. Roth: 30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8: 90,8 g Tris in 0,5 ml dest. H₂O lösen und pH 8,8 mit 1 N HCl einstellen.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8-Lösung: 30,3 g Tris in 0,5 ml dest. H₂O lösen und pH 6,8 mit 1 N HCl einstellen.

10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung: 1g Ammoniumpersulfat (APS, Fa. Merck) wurden in 9 ml dest. H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

10% (w/v) SDS-Lösung: In 90 ml dest. H₂O wurden 10 g SDS gelöst.

12, 5 %iges Trenngel: (add 10 ml)

4,06 ml Rotiphorese Gel 30
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
3,28 ml dest. H₂O
100 µl 10%ige SDS-Lösung
50 µl 10 %ige APS-Lösung
7,5 µl TEMED

3%iges Sammelgel:(add 5 ml)

0,5 ml Rotiphorese Gel 30
1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
3,1 ml dest. H₂O
50 µl 10%ige SDS-Lösung
25 µl 10 %ige APS-Lösung
7,5 µl TEMED

10 x SDS-Laufpuffer (add 1 Liter)

30 g Tris
144 g Glycine (Fa. AppliChem)
10 g SDS

Endkonzentration

= 250 mM Tris
= 1,92 M Glycine
= 1 % SDS

5x Probenauftragspuffer (add 30 ml)

15 ml 100% Glycerol
3 g SDS
7,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Spatelspitze Bromphenolblau

Endkonzentration

= 50 % Glycerol
= 5% SDS
= 125 mM Tris-HCl, pH 6,8

Der Probenauftragspuffer wurde in 1 ml Portionen aliquottiert und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 50 µl 2-Mercaptoethanol pro ml Probenauftragspuffer zugefügt.

4. 8. 4 **Coomassie Brilliant Blue-Färbung**

Die im Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue dargestellt werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,1– 2 µg pro Proteinbande. Die geladenen Proteinmengen lassen sich auf diese Weise optisch abschätzen, so daß Coomassie-gefärbte Gele als Beladungskontrolle für nachfolgende spezifische Nachweisverfahren wie z. B. Western-Blot dienen. Es wurde eine fertige kolloidale Coomassie-Suspension der Fa. Roth gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet.

4. 8. 5 **Verwendete Antikörper**

Anti-myc, Cat. No.: R950-25 (Fa. Invitrogen)
Anti-myc-HRP, Cat. No.: R951-25 (Fa. Invitrogen)
Anti-cdk2 (M2) (Fa. Santa Cruz)
Anti-cyclin E1 (M-20) (Fa. Santa Cruz)
Peroxidase-conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG (Fa. Dianova)

4. 8. 6 **Western Blot**

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden nach Anlegen einer elektrischen Spannung im halbtrockenem Milieu auf eine Membran transferiert. Dort werden diese mit Hilfe spezifischer primärer Antikörper markiert, die wiederum von sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpern erkannt werden. Mit Hilfe der gekoppelten Peroxidaseaktivität läßt sich das gesuchte Protein durch Belichtung eines Röntgenfilms detektieren.

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einer Semidry-Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran (Immobilon-P Transfer Membrane, Fa. Millipore) transferiert. Der Proteintransfer wurde mit Transferpuffer bei Raumtemperatur bei 30 Volt bzw. 300 mA in 25-30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran durch eine 1-stündige Inkubation in 5 %iger Magermilchlösung (Fa. Merck) in TBS-Tween abgesättigt, um den Anteil an unspezifischer Proteinbindung zu verringern. Es folgte nach kurzem Waschen in TBS-Tween die einstündige Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper, der nach den Angaben der jeweiligen Hersteller in Waschpuffer verdünnt wurde. Nach 3 Waschvorgängen in TBS-Tween-Lösung wurde die Membran über einen Zeitraum von einer Stunde mit einer 1:10000 Verdünnung des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-Tween-Lösung wurde der Blot abschließend mit dem Substratansatz gemäß den Angaben des Herstellers (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Fa. Perkin Elmer) entwickelt. Die durch die Peroxidase-Reaktion emittierte Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm dargestellt.

Transferpuffer, pH 8,3: (add 5 Liter)	Endkonzentration
14,5 g Glycine	= 39 mM Glycine
1,85 g SDS	= 0,037 % SDS
29,0 g Tris	= 48 mM Tris
1 Liter Methanol (Fa. J. T. Baker)	= 20 % Methanol
Der pH 8,3 wurde mit HCl eingestellt.	

Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6: (add 5 Liter)	Endkonzentration
12,1 g Tris	= 20 mM Tris-HCl
19 ml 1 N HCl	= 4 mM HCl
40,0 g NaCl	= 137 mM NaCl
5,0 ml Tween 20 (Fa. Sigma)	= 0,1 % Tween 20

4. 8. 7 Immunopräzipitation

Um aus Proteinlysaten eine Anreicherung bzw. Aufreinigung eines spezifischen Eiweißes oder die Isolation eines Komplexes aus mehreren Proteinen zu erreichen, wurden das Verfahren der Immunopräzipitation angewandt, daß auf folgendem Prinzip beruht: An Agarose-Partikel gekoppelte bakterielle Zellwandproteine (Zellwandprotein **A** aus *Staphylococcus aureus* oder Oberflächenrezeptor **G** aus *Streptococcus spec.*) binden IgG-Antikörper, die wiederum mit ihrem spezifischen Antigen Komplexe bilden. Diese tertiären Agarose-Protein **A/G**-Antikörper-Antigen-Komplex werden dann durch Zentrifugation pelletiert und vom übrigen Proteinlysate abgetrennt, so daß das Antigen anschließend höher konzentriert und isoliert vorliegt. In der vorliegenden Arbeit kam die Protein **A/G** PLUS-Agarose (Fa. Santa Cruz) zum Einsatz, die in der Lage ist, unterschiedliche IgGs und polyklonale Antikörper aus Maus, Ratte, Kaninchen und Ziege zu binden.

Routinemäßig wurde vor der eigentlichen Immunopräzipitation ein zusätzlicher Reinigungsschritt (Preclearance) durchgeführt. Dazu wurden 50 µl Protein **A/G** PLUS-Agarose zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und jeweils bei 2500 rpm bei 4°C in 1 Minute zentrifugiert sowie der Überstand dekantiert. Die Zugabe von ca. 25 µl NP40-Puffer ergab eine 50%ige Protein-Agarose-Suspension, die zu 1 mg/ml NP40-Proteinlysate (siehe 4.8.1) zugefügt wurde. Im Rotationsinkubator bei 4°C für 1 Stunde wurden alle Substanzen durch Bindung an die Protein-Agarose eliminiert, die im eigentlichen Immunopräzipitationsschritt störend wirken könnten. Bei 2500 rpm, 4°C und 3 Minuten wurden die Protein-Agarose-Komplexe abzentrifugiert. Der gereinigte Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1-2 µl Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C in Rotationsinkubator ständig durchmischt, so daß die Bindung des Antikörpers an sein spezifisches Antigen stattfinden konnte. Anschließend erfolgte die Zugabe von frischen 50 µl 50%iger Protein-Agarose-Suspension und die Inkubation bei 4°C für 1 Stunde im Rotationsinkubator. In diesem Schritt bildeten sich die tertiären Protein **A/G**-Agarose-Antikörper-Antigen-Komplexe, die durch 3-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm pelletiert wurden. Es schlossen sich zwei Waschschritte mit jeweils 1 ml kaltem NP40-Puffer und Zentrifugation für 3 Minute bei 4°C und 2500 rpm an. Der Überstand wurde immer komplett abgenommen. Das letzte Pellet wurde in 25 µl NP40-Puffer resuspendiert, mit 5 µl Probenauftragspuffer versetzt und durch Erhitzen auf

95°C für 10 Minuten wurden die Proteine denaturiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurden die Proteine im Überstand in der SDS-PAGE (siehe 4.8.3) aufgetrennt und durch Western Blotting (siehe 4.8.6) analysiert. Immunopräzipitate wurden schockgefroren bei –80°C gelagert.

4. 8. 8 **Histon H1-Kinase Assay**

Die Aktivität von Kinase-Komplexen kann durch die Übertragung einer radioaktiv markierten Phosphatgruppe auf ein spezifisches Substrat der Kinase ermittelt werden. Im Falle der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (cdk2), deren Aktivität von der Komplexbildung mit Cyclin E oder Cyclin A gesteuert wird, hat sich die radioaktive Phosphorylierung des Histon H1 etabliert.

Zu diesem Zweck reinigt man den Kinase-Komplex unter nativen Bedingungen durch Immunopräzipitation aus einem Proteinlysats auf (siehe 4.8.7). Die Agarose-Antikörper-Antigen-Komplexe wurden zweimal in NP40-Puffer und anschließend einmal mit 1 ml Histon-Waschpuffer gewaschen, 3 Minuten bei 2500 rpm bei 4°C zentrifugiert und die Überstände verworfen. In 30 µl Histone Assay-Lösung wurde das Pellet resuspendiert und 45 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei alle 10 Minuten erneut durchmischt wurde. Die Zugabe von 6 µl 5 x Probenauftragspuffer stoppte die Kinasereaktion ab. Es folgte die Denaturierung der Proteine für 5 Minuten bei 95°C, die Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 rpm, die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und die anschließende Gel Trocknung. Die radioaktiven Signale wurden auf Röntgenfilm detektiert.

Histon-Waschpuffer: (add 100 ml)	Endkonzentration
2,5 ml Tris-HCl, pH 7,5	= 25 mM Tris-HCl, pH 7,5
7,7 ml 1 M NaCl-Lösung	= 70 mM NaCl
0,5 ml 2 M MgCl ₂ -Lösung	= 10 mM MgCl ₂
200 µl 1 M DTT-Lösung	= 1 mM DTT
Histon Assay-Puffer: (add 0,5 ml)	Endkonzentration
5 µl Histone H1 (5 µg/µl, Fa. Upstate)	= 0,05 µg/µl
100 µl kaltes dATP (10mM, Fa. Invitrogen)	= 20 mM
7 µl ³² P-γATP (10mCi/ml, Fa. Amersham)	= 140 µCi/ml
388 µl Histone Waschpuffer	

4. 9 **Zellbiologische Methoden**

4. 9. 1 **Verwendete Zelllinien**

Huh7: Die humane Hepatomzelllinie Huh7 (NAKABAYASHI et al, 1984) wurden zur Transfektion von Expressionsplasmiden und zur Herstellung stabil-transfizierter Zelllinien benutzt.

NIH/3T3: Zur Herstellung stabil-transfizierter Zellen dienten murine embryonalen Fibroblasten (MEF) der Zelllinie NIH/3T3 (TODARO und AARONSON, 1968; JAINCHILL et al, 1969), die mit ausreichender Effizienz transfiziert und durch Serum-entzug vollständig in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren werden können.

4. 9. 2 Allgemeine Zellkulturverfahren

Folgende spezifische Verbrauchsmaterialien kamen zum Einsatz:

Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S.02, Fa. Sarstedt
Einwegspritzen	Injekt/Luer 5 ml, 10 ml, 20 ml, Fa. Braun
Filtrationssysteme	Steriflip, 25 ml, 0,22 µm, Fa. Millipore
	Stericup, 150 ml, 0,22 µm, Fa. Millipore
Zellkulturplatten	96-Well mit Flachboden, Fa. Costar
Zellkulturflaschen	75 cm ² , Filterdeckel, Fa. Costar
	25 cm ² , Filterdeckel, Fa. Nunc
Zellkulturschalen	6 cm Durchmesser, Fa. Greiner

Folgende Medien, Puffer und Zusätze wurden allgemein für die Zellkultur benötigt:

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (enthält L-Alanyl-L-Glutamine, Natriumpyruvat, 4,5 g/L Glucose und Pyridoxine), Fa. Invitrogen

10x PBS (w/o Calcium und Magnesium), Fa. Invitrogen: Die Verdünnung mit dest. H₂O ergab eine 1x Gebrauchslösung, die durch Autoklavierung keimfrei gemacht wurde.

100x Penicillin/Streptomycin (10.000 units; 10mg/ml), Fa. PAA

Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Sigma

Fungizone, Antimykotikum, 250µg/ml Amphotericin, Fa. Invitrogen

Foetales Rinderserum (FCS), Lot: 40F1500K, Fa. Invitrogen

10x Trypsin/EDTA-Lösung (in 10x PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺), Fa. Biochrom: Durch Verdünnen mit PBS wurde eine 1x Gebrauchslösung hergestellt und steril filtriert.

Zellkulturmedium:

<u>500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I</u>	<u>Endkonzentration</u>
50 ml FCS	10% (v/v)
10 ml 100x Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/ml
350µl Fungizone	0,175 µg/ml

Huh7-Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Hierzu wurden Huh7 kurz in 1 x Trypsinlösung geschwenkt und für 4 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Klopfen von der Flaschenwand abgelöst und in DMEM-Medium resuspendiert wurden die Hepatoma-Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 in 250 ml Zellkulturflaschen ausgesät.

NIH/3T3-Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Konfluenz war strikt zu vermeiden, da die embryonalen Fibroblasten sonst unerwünschte Differenzierungsprozesse beginnen. Alle drei Tage oder

bei einer Konfluenz von 50 % wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Hierzu wurden NIH/3T3-Zellen kurz in 1x Trypsinlösung geschwenkt und für 1 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Klopfen von der Flaschenwand abgelöst und in DMEM-Medium resuspendiert wurden Fibroblasten im Verhältnis 1:4 in 250 ml Zellkulturflaschen ausgesät.

Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium wurde durch Zugabe von zusätzlich 10% FCS und 10% DMSO zum Zellkulturmedium hergestellt. Die Zellen wurden mit 1x Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst und durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 2x Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen (Fa. Nunc) überführt und bei -80°C vorgefroren. Nach ca. 24 Stunden wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen

Die dem Stickstofftank entnommenen Zellen wurden rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden mit 10 ml Kulturmedium verdünnt und in Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen wurde das Medium noch einmal gewechselt.

4. 9. 3 Methoden zur Transfektion somatischer Zellen

Transfektion nach CHEN und OKAYAMA (1987)

Die von Chen und Okayama entwickelte Methode zur transienten Transfektion basiert auf der endozytotischen Aufnahme von DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitaten durch eukaryontische Zellen unter Schockbedingungen.

Die Huh7-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6 cm Zellkulturschalen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml ausgesät. Pro Kulturschale wurden 3 ml Zellsuspension eingesetzt. Zur Transfektion wurden 5 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde zunächst mit 150 µl 0,25 M CaCl₂-Lösung vermischt, anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 2 x BBS-Puffer, pH 6,9. Der Ansatz wurde vorsichtig mit der Pipette durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Ausbildung der DNA-Calciumphosphat-Präzipitate inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde unter leichtem Schwenken der Zellkulturschale auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 16 Stunden unter Schockbedingungen (35°C und 3% CO₂) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und der Zugabe von frischem DMEM-Medium wurden die Zellen bis zur Ernte bei den jeweils angegebenen Zeitpunkten unter normalen Zellkulturbedingungen gehalten.

0,25 M CaCl₂-Lösung: 1,84 g CaCl₂ x 2 H₂O wurden frisch in 50 ml dest. H₂O gelöst.

2x BBS-Puffer, pH 6,9: (add100 ml)	Endkonzentration
1,64 g NaCl	= 280 mM NaCl
1,07 g BES (Fa. Sigma)	= 50 mM BES
0,03 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	= 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O

Transfektion mit PolyFect Transfection Reagent (Fa. Qiagen)

Humane Hepatomazellen können mit hinreichender Effizienz mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert werden, wogegen es für die Einschleusung von Plasmid-DNA in murine Zellen eines speziellen Reagenz bedarf. In dieser Arbeit wurden das PolyFect Transfection Reagent zur stabilen Transfektion von murinen embryonalen Fibroblasten der Linie NIH/3T3 verwendet. Durch rezeptorvermittelte Endozytose (transmembrane Asialoglykoproteine) gelangen die PolyFect-DNA-Komplexe als Endosomen in die Zelle und werden in den Kern transportiert.

Die NIH/3T3-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 25 cm²-Zellkulturflasche einer Dichte von 8×10^5 Zellen in 3 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 30–60 Minuten vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Zur Transfektion wurden pro Flasche 2,5 µg linearisierte DNA mit 150 µl Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (ohne Zusätze) verdünnt und anschließend mit 15 µl PolyFect Reagent versetzt und gevortext. Zur Bildung der PolyFect-DNA-Komplexe folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, an deren Ende 1 ml Zellkulturmedium mit den PolyFect-DNA-Komplexen vermischt wurde. Das Zellkulturmedium der NIH/3T3-Zellen wurde mit dieser Suspension supplementiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde mit der Antibiotikaselektion begonnen, um untransfizierte Zellen zu eliminieren.

4.9.4 β-Galaktosidase-Assay

Der β-Galaktosidase-Expressionsvektor dient aufgrund der starken, vom CMV-Promotor abhängigen Expression des β-Galaktosidase-Gens als Kontrolle der Transfektionseffizienz und somit als Korrekturgröße für durch Transfektionsexperimente gewonnene Ergebnisse. Die Aktivität der β-Galaktosidase kann in Zellextrakten mit geeigneten Substraten in einer Farbreaktion spektrophotometrisch schnell und einfach nachgewiesen und quantifiziert werden.

Im allgemeinen wurden pro Transfektionsansatz von 5 µg DNA je nach beabsichtigter Expressionsdauer bzw. Zelltyp 0,3–1 µg CMV-β-Galaktosidasevektor zugesetzt. Der Anteil wurde dahingehend optimiert, daß die Reaktionszeit mindestens 15 Minuten betrug, aber möglichst 1 Stunde nicht überschritt. Transfizierte Zellen wurden 18–24 Stunden nach Mediumwechsel zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 350 µl 1x Extraktionspuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysats abgeschat und 5 Minuten in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung seiner Aktivität auf Eis gelagert. 10 µl der Zellextrakte wurden mit 100 µl Assaypuffer bis zu einer leichten Gelbfärbung bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 1 M Natriumcarbonat wurde der Ansatz noch etwa 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt und im Anschluß die Färbung bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert (pBS transfizierte Kontrolle) gemessen. Der lineare Bereich reicht von 0,2 bis 0,8 OD₄₀₅.

5x Extraktions-Puffer: (add 100 ml)	Endkonzentration
12,5 ml 1M Tris/phosphat (pH 7,8 mit H ₃ PO ₄)	= 125 mM Tris/phosphat, pH 7,8
2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	= 10 mM EDTA, pH 8,0
50 ml 100% Glycerol	= 50 % Glycerol
5 ml Triton X- 100 (Fa. Sigma)	= 5% Triton-X100
frisch zufügen:	
2 µl/ml 1 M DTT-Lösung	= 2 mM DTT
Assaypuffer: (add 1 Liter)	Endkonzentration
10,7 g Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	= 60 mM Na ₂ HPO ₄
5,4 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	= 39 mM NaH ₂ PO ₄
10 ml 1 M KCl-Lösung	= 10 mM KCl
1 ml 1M MgSO ₄ -Lösung	= 1 mM MgSO ₄
frisch zufügen:	
2 µl/ml 1 M DTT-Lösung	= 2 mM DTT
1 mg/ml ONPG (Fa. Sigma)	

1 M KCl-Lösung: 7,65 g KCl (Fa. Merck) in 100 ml dest.H₂O lösen.

1 M MgSO₄-Lösung: 24,7 g MgSO₄ x 5 H₂O (Fa. Merck) in 100 ml dest.H₂O lösen.

1 M Natriumcarbonat-Lösung: 106 g Na₂CO₃ in 1 Liter dest.H₂O lösen.

4. 9. 5 Etablierung stabil-transfizierter Zelllinien

Stabil-transfizierte Zelllinien zeichnen sich durch die dauerhafte Integration eines Plasmids in das Genom der Zellen aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Transfektion (siehe 4. 9. 3) linearisierte Plasmide, die eine zusätzlich Resistenz gegen die Antibiotika Zeocin oder G 418 vermitteln, in NIH/3T3- oder Huh7-Zellen eingeschleußt. Es schloß sich eine Antibiotika-Behandlung für 10 Tage an, die nicht-rekombinante Zellen eliminierte. Die überlebenden Zellen, die durch Integration des Plasmids resistent gegen das entsprechende Antibiotikum waren, wurden mittels PCR, RT-PCR und Western Blot analysiert. Den Zellkulturmedien wurde ständig das entsprechende Antibiotikum zugefügt, so daß der fortgesetzte Selektionsdruck eine Deletion des integrierten Plasmids verhinderte.

Zeocin, Glycopeptid-Antibiotikum, steril, 100mg/ml, Fa. Cayla

G418, Geneticin, Fa. Sigma: Die Herstellung einer 100mg/ml Stocklösung erfolgte durch Aufnehmen der *aktiven* Menge G418 in 1x PBS und sterile Filtration.

4. 10 Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts durch FACS-Analyse

4. 10. 1 Ernte und Fixierung von Zellen

NIH/3T3-Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen in einer Dichte von 6×10^5 Zellen in 3 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach experimenteller Fragestellung schlossen sich unterschiedliche Behandlungsschritte an.

Zur Ernte wurden die Zellen 2 mal mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml 1x Trypsin vom Schalenboden abgelöst. Nach Abstoppen der Trypsinierungsreaktion mit 3 ml Zellkulturmedium wurden die Zellen in 15 ml Schraubdeckelröhrchen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm bei Raumtemperatur pelletiert. Nach Resuspendierung mit 1 ml PBS wurden die Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut 5 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Fixierung der Zellen erfolgte die Resuspendierung in 1 ml eiskaltem 70% Methanol/30% PBS-Lösung und Inkubation bei 4°C für 10 Minuten. Es schloß sich ein 5-minütiger Zentrifugations-schritt von 1500 rpm an. Nachdem das entstandene Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen worden war, konnten die Zellen bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

4. 10. 2 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (Fa. Sigma) ist eine Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen interkaliert. Durch Laserlicht von 488 nm angeregt, emittiert Propidiumiodid rotes Licht mit Wellenlängen um 600 nm. Propidiumiodid wird als Standardfarbstoff zur Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts in der Durchflußzytometrie eingesetzt.

Propidiumiodid-Färbelösung: (add 10 ml mit PBS)

100 µl RNase A (10mg/ml, Fa. Sigma)

250 µl Propidiumiodid-Lösung (1mg/ml, Fa. Sigma)

Rnase A baut doppelsträngige RNA ab, an die Propidiumiodid ebenfalls bindet und die Messung des DNA-Gehaltes verfälschen würde.

Die in PBS bei 4°C gelagerten Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, in 1 ml Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und in FACS-Röhrchen (5ml Rundbodenröhrchen, Fa. Becton Dickinson Labware) für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Alumniniumfolie lichtdicht verpackt bis zur Messung des DNA-Gehalts aufbewahrt.

4. 10. 3 FACS-Analyse

Zur Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts kam der fluorescence-associated cell sorter FACScalibur (Fa. Becton Dickinson) mit den zugehörigen Lösungen (FacsRinse, FacsClean und FacsFlow, Fa. Becton Dickinson) zum Einsatz. Das Gerät wurde nach den Vorgaben des Herstellers betrieben.

Vor der Messung, die jeweils 10000 Zellen umfasste, wurden die Proben intensiv gevortext, um möglichst viele Einzelzellen zu erhalten. Vom Gerät angesaugt wanderten die Propidiumiodid-gefärbten Zellen durch den 488nm-Lichtstrahl eines Argon-Lasers und wurden zum Leuchten angeregt. Die Intensität des abgestrahlten Lichtes war der Menge der enthaltenen DNA proportional. Aus Histogrammen, die die Zellpopulationen mit einheitlicher Propidiumiodid-Fluoreszenz mit der Intensität der Propidiumiodid-Fluoreszenz linear korrelierten, wurden der prozentuale Anteile an Zellen mit Sub-G1(< 2N)-, G1(2N)-, S (> 2N)- und G2/M (4N)-DNA-Gehalt bestimmt. Diese Daten ließen Rückschlüsse auf den Ablauf des Zellzyklus zu.

4. 11 Manipulation embryonaler Stammzellen von *Mus musculus*

Im Modellorganismus Hausmaus *Mus musculus* Linneaus, 1758 ist es durch Manipulation embryonaler Stammzellen gelungen, auf genomischer Ebene Gene zu inaktivieren (Knockout) oder Mutationen einzuführen (Knockin). Die durch Defizienz oder Mutagenisierung eintretenden Fehlentwicklungen und Fehlfunktionen können über die grundlegende Rolle eines Gens im embryonalen und adulten Organismus Auskunft geben. Ist der konstitutive Knockout eines Gens embryonal lethal, können Gene neuerdings auch konditional ausgeschaltet werden, so daß ein Gen erst im adulten Organismus inaktiviert wird.

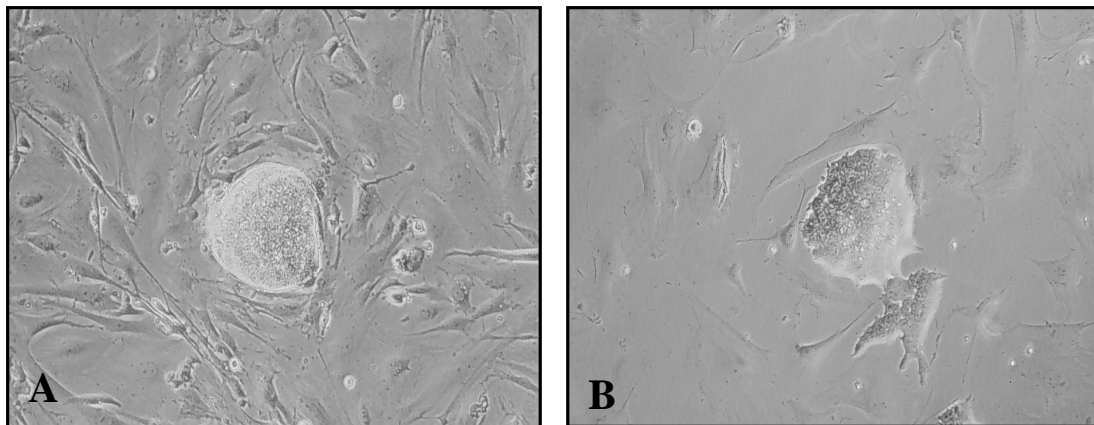


Abbildung 5: ES-Zellkolonien auf Feederlayern. **A** undifferenzierte Kolonie embryonaler Stammzellen mit glattem Rand und weicher Oberfläche. **B** Kolonie differenzierter ES-Zellen mit rauhem Rand und unregelmäßiger Oberfläche

4. 11. 1 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Die durchgeführten Experimente zur genetischen Manipulation der Maus basieren auf der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen, die aus dem Embryoblast von Blastozysten am Tag 3,5 p.c. isoliert werden (STARCK, 1975; ABBONDANZO et al, 1993; HOGAN et al, 1994). In dieser Arbeit wurden ES-Zellen mit differierendem genetischen Hintergrund und unterschiedlicher Herkunft benutzt:

Bezeichnung	Inzuchtstamm	Herkunft
Bruce4	C57BL/6	Dr. W. Müller, GBF, Braunschweig
R1	129/Sv	Dr. A. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto
E14TG2a	129Ola	Dr. D. Riethmacher, ZMNH, Hamburg

Folgende Medien und Zusätze wurden für die ES-Zellkultur verwendet:

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (enthält L-Alanyl-L-Glutamine, Natriumpyruvat, 4,5 g/L Glucose und Pyridoxine), Fa. Invitrogen

Foetales Rinderserum (ES-Zellen getestet): Lot 437 A, Fa. Biochrom

1x Trypsin-EDTA, 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA-Na und Phenolrot, Fa. Invitrogen

100x Penicillin/Streptomycin (10.000 units; 10mg/ml), Fa. PAA

Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x, 10 mM, flüssig, Fa. Invitrogen

ESGRO®, Fa. Chemicon International, 10^7 units/ml rekombinantes LIF: 1 ml ESGRO wurde mit 19 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I auf eine Konzentration von 5×10^5 units/ml verdünnt, in 500 µl Portionen aliquottiert und bei 4°C gelagert.

2-Mercaptoethanol, Fa. Sigma: Für eine 100 mM Stocklösung wurden 50 µl 2-Mercaptoethanol in 7 ml PBS verdünnt und steril filtriert.

Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Sigma

Das **ES-Zellkulturmedium** hatte folgende Zusammensetzung (HOGAN et al, 1994):

409 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I	Endkonzentration
75 ml FCS	= 15% (v/v)
10 ml 100x Penicillin/Streptomycin	= 0,1 mg/ml
5 ml 100x Nicht-essentielle Aminosäuren	= 1 mM
500 µl LIF (5×10^5 units/ml)	= 1000 units/ml
500 µl 100 mM 2-Mercaptoethanol	= 100 µM

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) wird als Zytokin zur Aufrechterhaltung des undifferenzierten, pluripotenten Zustands von ES-Zellen benötigt (SMITH et al, 1988; ABBONDANZO et al, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zur Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf Feederlayern, die LIF sekretieren, rekombinantes murines mLIF (ESGRO®) in angegebener Konzentration eingesetzt.

Anzucht von ES-Zellen

Hauptsächliches Augenmerk in der Kultivierung embryonaler Stammzellen war darauf zu richten, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand mit intaktem Karyotyp zu erhalten, der als unbedingte Voraussetzung für spätere Integration der ES-Zellen in den Embryo und die Keimbahntransmission anzusehen ist. Suboptimale Kulturbedingungen führen zur

Selektion von Zellen mit höherer Wachstumsrate durch Mutationen und chromosomalem Rearrangement. Ein Mangel an Wachstumsfaktoren und zu langes Wachsen in zu hoher Dichte begünstigen die Differenzierung zu Endoderm-Zellen. Unter optimalen Bedingungen wachsen aus vereinzelter ES-Zellen auf einem Feederlayer rundliche, dicht gepackten ES-Kolonien mit glatten Rändern heran. Die einzelne ES-Zelle ist dabei relativ klein und besitzt einen klaren Zellkern mit ein bis mehreren Nukleoli. Als Zeichen einsetzender Zelldifferenzierung ist das Auftreten eines umgebenden, endodermalen Zellhofes auf der Feederunterlage und eine rauhe Rand- und Oberflächentextur der ES-Zellkolonie zu werten (Abb. 5). Es wird empfohlen, die ES-Zellen nicht länger als 4 Wochen vor Versuchsbeginn in Kultur zu nehmen (HOGAN et al, 1994).

Die Kultivierung der ES-Zellen fand auf sogenannten Feederlayern, einer konfluenten Einzelschicht muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) statt, die mitotisch inaktiviert wurden. Diese sekretieren LIF ins Zellkulturmedium und erzeugen eine extrazelluläre Matrix, die den ES-Zellen als Adhäsionsfläche dient.

ES-Zellen wurden in 10 cm-Zellkulturschalen mit 12 ml ES-Zellkulturmedium bei 37°C mit 5% CO₂ expandiert. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 bis 1:8 geteilt und auf frischen Feederlayern ausgesät. Dazu wurden die ES-Zellen ca. 2 Stunden vor Passagierung mit frischem Medium versorgt, dann zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und in 2 ml Trypsinlösung für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen am Schalenrand fand die Ablösung der ES-Zellen vom Schalenboden statt, dem sich die Vereinzelnung durch ca. zehnmalsiges Auf- und Abpipettieren anschloß. Am Tag zwischen den Passagierungen erfolgte ein Medienwechsel (vergleiche ABBONDANZO et al, 1993; RAMIREZ-SOLIS, DAVIS und BRADLEY, 1993).

Kryokonservierung von ES-Zellen

2x Einfriermedium wurde durch Zugabe von zusätzlich 35% FCS und 20% DMSO zum ES-Zellkulturmedium hergestellt. Trypsinierung und Vereinzelnung der ES-Zellen erfolgten wie beschrieben (siehe oben). Die Trypsinierungsreaktion wurde durch Zugabe von ES-Medium gestoppt und die Zellzahl in der Suspension durch Auszählung in der Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurden die ES-Zellen durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellpellet wurde in ES-Zellkulturmedium resuspendiert und eine Dichte von 1×10^6 Zellen/500µl eingestellt. Nach Zugabe von 50% (v/v) 2 x Einfriermedium erfolgte die Konservierung in Portionen zu 1×10^6 Zellen/1 ml in Kryoröhrchen (Fa. Nunc) bei -80°C und nach ca. 24 Stunden wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen

Die dem Stickstofftank entnommenen Zellen wurden rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 12 ml ES-Zellkulturmedium verdünnt und in 10 cm-Zellkulturschalen auf Feederlayern bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen wurde das Medium noch einmal gewechselt.

4. 11. 2 Kultivierung muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Murine embryonale Fibroblasten (MEF), die aus Embryonen am Tag 13 p.c. gewonnen werden (ABBONDANZO et al, 1993), dienen der Herstellung von Feederlayern, die zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Status ausgesäter ES-Zellen beitragen (HOGAN et al, 1994). Die hier verwendeten MEFs, in deren Genom ein Neomycintransferase-Resistenzgen integriert war, wurden von Dr. W. Müller, GBF, Braunschweig und Dr. D. Riethmacher, ZMNH, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Folgende Medien und Zusätze fanden Verwendung:

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (enthält L-Alanyl-L-Glutamine, Natriumpyruvat, 4,5 g/L Glucose und Pyridoxine), Fa. Invitrogen

Foetales Rinderserum, Lot: 40A0500K, Fa. Invitrogen

10x Trypsin/EDTA-Lösung (in 10x PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}), Fa. Biochrom:

Durch Verdünnen mit PBS wurde eine 1x Gebrauchslösung hergestellt und steril filtriert.

100x Penicillin/Streptomycin (10.000 units; 10 mg/ml), Fa. PAA

Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x, flüssig, Fa. Invitrogen

Gelatine, Fa. Merck: Eine 2% (w/v) Gelatine-Stocklösung wurde hergestellt, aus der durch Verdünnung und Filtration eine sterile 0,1% (w/v) Gelatine-Lösung erzeugt wurde.

Mitomycin C, Fa. Sigma: 2 mg Mitomycin C wurden in 100 µl DMSO gelöst und in 1,9 mg PBS aufgenommen.

Das **MEF-Zellkulturmedium** hatte folgende Zusammensetzung (HOGAN et al, 1994):

435 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I	Endkonzentration
50 ml FCS	= 10% (v/v)
10 ml 100x Penicillin/Streptomycin	= 0,1 mg/ml
5 ml 100 x Nicht-essentielle Aminosäuren	= 1 mM

Kultivierung von MEFs

Murine embryonale Fibroblasten können effektiv nur über 5-6 Passagen hinweg kultiviert werden, da dieser Zelltyp sehr schnell zur Seneszenz mit Zellhyperplasie und verminderter Wachstumsrate neigt. Weiterhin ist zu beachten, daß eine Gelatine-Beschichtung die Adhäsion der MEFs deutlich erleichtert. Zur Beschichtung wurde 5 ml 0,1%ige Gelatine-Lösung in eine 150 cm² Zellkulturflasche (mit Filterdeckel, Fa. Nunc) gegeben, deren Boden durch Schwenken vollständig bedeckt und durch eine 30-minütige Inkubation bei 37°C beschichtet wurde. Überschüssige Gelatine-Lösung wurde anschließend abgesaugt.

Dem schnellen Auftauen einer Portion MEFs bei 37°C im Wasserbad, die in flüssigem Stickstoff konserviert worden waren, folgte die Kultur der Zellen in 25 ml MEF-Zellkulturmedium in einer gelatinisierten 150 cm² Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO₂. Alle drei Tagen wurden die MEFs umgesetzt, wozu das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und mit 5 ml 1x Trypsin für 5 Minuten bei 37°C trypsinisiert wurden. Anschließend wurde die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden abgelöst bzw. vereinzelt, die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von 5 ml MEF-Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue

Zellkulturflaschen verteilt (ABBONDANZO et al, 1993; RAMIREZ-SOLIS, DAVIS und BRADLEY, 1993).

4. 11. 3 Herstellung von Feederlayern

MEFs, aus denen Feederlayer hergestellt werden sollen, müssen mitotisch inaktiviert werden, um ein Überwachsen der ES-Zellen durch die Fibroblasten zu verhindern. Mitomycin C, ein von *Streptomyces caespitosus* erzeugtes Zellgift, bewirkt einen irreversiblen Zellzyklusarrest durch Alkylierung und Vernetzung von DNA (TOMAZS et al, 1987). Zur Inaktivierung wurde das Medium abgesaugt und die Fibroblasten mit frischem 20 ml Medium mit 10 µg/ml Mitomycin C für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Entfernung des Mitomycin C wurden die MEFs anschließend mehrfach mit 30 ml PBS gewaschen. Es folgte die Ernte der Zellen (siehe 4.11.2) und die Bestimmung der Zellzahl. Folgende Zellmengen wurde ausgesät, um konfluente Feederlayer zu erzeugen:

Zellkulturgefäß	Zellzahl	Medium
10 cm-Schale	1,2 x 10 ⁶	12 ml
6 cm-Schale	5 x 10 ⁵	3 ml
3 cm-Schale	1,2 x 10 ⁵	1,5 ml
96-Well-Platte	6 x 10 ⁵	9,6 ml

4. 11. 4 Transfektion von ES-Zellen durch Elektroporation

Vergleichende Studien haben ergeben, daß die Elektroporation das effektivste Verfahren zur Einschleußung von DNA in ES-Zellen ist (LOVELL-BADGE, 1987; RAMIREZ-SOLIS, DAVIS und BRADLEY, 1993; HOGAN et al, 1994).

3–4 Stunden vor der Ernte wurde frisches Medium auf die ES-Zellen gegeben. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin für 3–5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die ES-Zellen wurden durch Schütteln und Pipettieren vom Boden gelöst, vereinzelt und anschließend zum Abstoppen der Trypsinierungsreaktion in 4 ml ES-Medium aufgenommen. Nach Vereinigung der Zellsuspensionen von zwei 10 cm-Zellkulturschalen in einem 50 ml Schraubdeckelröhrchen folgte die Bestimmung der Zellzahl durch Auszählung in der Neubauer-Kammer. Währenddessen wurden die Zellen bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Resuspension der Zellen in PBS. 1,2 x 10⁷ ES-Zellen wurden abgenommen, bei 1000 rpm bei Raumtemperatur für 5 Minuten pelletiert und mit 25 µg linearisiertem Gene Targeting Vektor in 800 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Diese 800 µl Zellsuspension wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Fa. Invitrogen) überführt und die Elektroporation in Gene Pulser II (Fa. BIO-RAD) bei 230 Volt und 500µF durchgeführt. Die Zeitkonstante sollte 7–8 Millisekunden betragen. Die elektroporierten ES-Zellen wurden in 40 ml ES-Medium aufgenommen und auf vier 10 cm-Zellkulturschalen mit Feederlayern ausgesät. Mit dem gleichen Verfahren wurden 1 x 10⁶ ES-Zellen mit 3 µg

zirkulärem Cre-Plasmids elektroporiert und in einer 10 cm-Zellkulturschale auf einem Feederlayer ausgesät.

Elektroporationspuffer:

Stocklösung	[g / ml]	ad 50 ml	Endkonzentration
1M NaCl	2,92 g/50 ml	6,85 ml	137 mM
1M KCl	3,73 g/50 ml	0,25 ml	5 mM
0,5 M Na ₂ HPO ₄	3,55 g/50 ml	70 µl	0,7 mM
0,5 M Glucose	4,95 g/50 ml	0,6 ml	6 mM
0,1 M 2-Mercapthoethanol	50 µl/7 ml PBS	50 µl	0,1 mM
1 M Hepes, pH 7,0	13 g/ 50 ml	1,0 ml	20 mM

pH 7,0 wurde mit NaOH eingestellt.

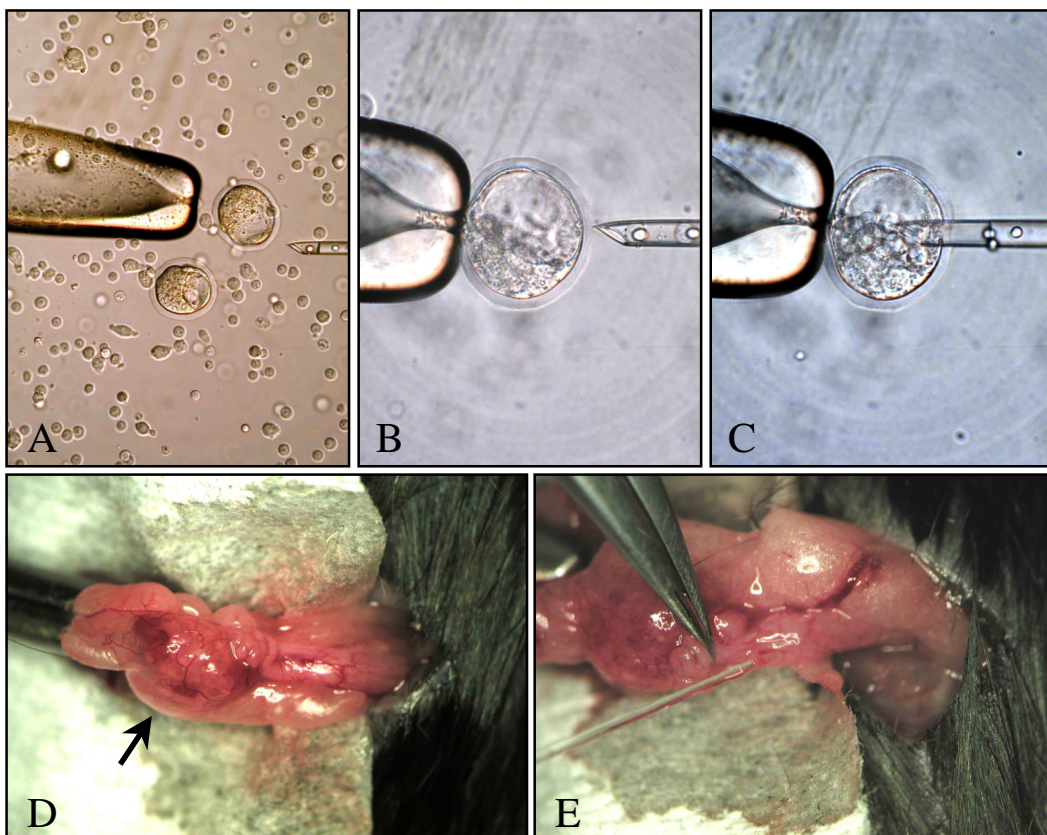


Abbildung 6: Blastozysteninjektion und Implantation. **A** Die vorbereiteten Blastozysten und ES-Zellen wurden in Embryonenmedium auf einem Spezialobjekträger im Mikromanipulator bemischt. **B** Zur Injektion wurde die Blastozyste durch die Haltekapillare festgesaugt, wobei die innere Zellmasse ventral lag; die Injektionskapillare zielte auf einen Spalt zwischen zwei Trophoblasten. **C** Einstich der Injektionskapillare in die Blastozyste und Injektion der ES-Zellen. **D** Ovar, Ovidukt und Uterus der Maus wurden zur Implantation der injizierten Blastozysten aus der Körperhöhle nach außen gezogen; Pfeil: Gelbkörper. **E** Implantation der Blastozysten mittels Glaskapillare in den Uterus der Maus.

4. 11. 5 Selektion und Isolation von ES-Zellklonen

24 Stunden nach der Elektroporation begann die Positivselektion rekombinanter ES-Zellen mit integriertem Targeting Vektor durch G418 für die Dauer von 7-10 Tage. In Abhängigkeit vom Promotor, der die Neomycinphosphotransferase kontrollierte, waren unterschiedliche G418-Konzentrationen für eine effektive Selektion notwendig:

PGK-Neomycinphosphotransferase	230µg/ml
HSVTK-Neomycinphosphotransferase	400µg/ml

Am vierten Tag der G418-Selektion wurde mit der dreitägigen Negativselektion durch Ganciclovir begonnen. Ganciclovir ist ein Nukleosidanalogs, das von der Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSVTK) in ein toxisches Derivat umgewandelt wird. Durch diese Behandlung starben ES-Zellen ab, die durch zufällige Integration des Gene Targeting-Konstrukts das vollständige HSVTK-Gen im Genom aufwiesen.

Sobald die überlebenden ES-Zellklone die entsprechende Größe erreicht hatten, erfolgte die Isolation in 96-Well-Platten mit Feederlayern. Die 10 cm-Schalen mit den ES-Zellklonen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 ml PBS überschichtet. Unter der Stereolupe und in einem Volumen von 20 µl wurden die Klone einzeln mit einer Pipette gepickt und auf 96-Well-Platten mit Rundboden überführt. Waren 48 Wells mit ES-Klonen gefüllt, folgte die Zugabe von 25 µl Trypsin und die Inkubation bei 37°C für 4 Minuten. Es schloß sich das Abstoppen der Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von 70 µl ES-Medium an, dem die Vereinzlung der ES-Zellen durch schnelles Auf- und Abpipettieren folgte. Die je 115 µl ES-Zellsuspension pro Well wurde auf 96-Well-Platten mit Feederlayer überführt, in die 100µl ES-Zellkulturmedium pro Well vorgelegt worden waren. Nach 3-5 Stunden wurde das ES-Zellkulturmedium auf den adhären ES-Zellen gewechselt. 3-5 Tage nach Isolation konnten die ES-Zellen von den 96-Well-Platten geteilt werden. Das ES-Zellmedium wurde abgesaugt, die Wells mit zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und die ES-Zellen durch 50 µl Trypsin bei 37°C für 4 Minuten gelöst. Durch 50 µl ES-Zellkulturmedium wurde die Trypsinierungsreaktion gestoppt und ES-Zellen durch schnelles Auf- und Abpipettieren vereinzelt. 1/3 dieser Suspension wurden auf eine gelatinierte 96-Well-Platte überführt und pro Well mit 100 µl ES-Zellkulturmedium angereichert, so daß die ES-Zellen zur Präparation genomischer DNA 5-7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ vermehrt werden konnten. Die verbleibenden 2/3 der Zellsuspension in der Originalplatte wurde mit einem Volumen 2x Einfriermedium vermischt und die Zellen auf der Masterplatte bei -80°C eingefroren.

G418, Geneticin, Fa. Sigma: Die Herstellung einer 100mg/ml Stocklösung erfolgte durch Aufnehmen der *aktiven* Menge G418 in PBS und sterile Filtration.

Ganciclovir-Na, **Cymeven®**, Fa. Roche: Eine 400mM Stocklösung wurde aus 543 mg Ganciclovir und 5,05 ml dest. H₂O hergestellt und bei -80°C gelagert; 50µl dieser Stocklösung wurden mit 10 ml ES-Medium zur 2mM Ganciclovir-Gebrauchslösung gemischt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

4. 11. 6 Präparation von ES-Zell-DNA

Die klonalen ES-Zellen auf 96-Well-Platten wurden zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und 50 µl ES-Lysepuffer pro Well zugegeben. Die Lyse fand über Nacht bei 55°C im Wärmeschrank in einer feuchten Kammer statt. Die Fällung der genomischen DNA wurde anschließend durch Zugabe von 100 µl 100%igem Ethanol und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt, so daß die ausgefallene DNA in den Wells als faserige Strukturen unter dem Mikroskop erkennbar war. Der Alkohol wurde durch Umdrehen der Platte abgeschüttet, die DNA zweimal mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und sofort weiter prozessiert (siehe 4.11.7).

ES-Lysepuffer: (add 100 ml)	Endkonzentration
1 ml 1 M NaCl-Lösung	= 10 mM NaCl
1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5	= 10 mM Tris-HCl
2 ml 0,5 M EDTA-Lösung	= 10 mM EDTA
0,5 g N-Lauroyl-sarcosine (Fa. Sigma)	= 0,5 % (w/v) N-Lauroyl-sarcosine

4. 11. 7 Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone

Durch Restriktionsspaltung, Agoarosegelelektrophorese, Southern Blotting und radioaktive Hybridisierung konnten ES-Zellen mit einem rekombinanten Allel identifiziert werden. Neben der Wildtypbande, die in der DNA des Inzuchtstammes und in den ES-Zellklonen mit zufälliger Integration des Gene Targeting-Konstrukts als einzige vorhanden ist, müssen rekombinante Klone eine weitere spezifische Bande definierter Größe aufweisen, die das rekombinante Allel repräsentiert. Die getrocknete DNA der ES-Zellen in 96-Well-Platten wurde in 40 µl Volumen durch eine Restriktionsendonuklease über Nacht bei 37°C in der feuchten Kammer hydrolysiert. Durch Zugabe von 8 µl 5 x DNA-Ladepuffer wurde die Restriktionsspaltung gestoppt und die DNA-Fragmente in einem 0,8%-Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und durch Southern Blotting auf eine Nylonmembran übertragen, die mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert wurde. Die radioaktiven Signale wurden auf Röntgenfilm detektiert.

Aus Zellen derjenigen ES-Zellklone, die die erste Analyse als rekombinant identifizierte, wurde nach dem Auftauen und Expandieren erneut DNA gewonnen und einer zweiten Analyse auf homologe Rekombination unterzogen.

4. 11. 8 Herstellung chimärer Mäuse

Integrieren sich rekombinante murine ES-Zellen, die in Blastozysten eines differierenden Inzuchtstammes injiziert wurden, in den Embryo, so entstehen Mäuse, deren Gewebe mosaikartig aus Zellen mit zwei unterschiedlichen Genotypen aufgebaut sind. Diese Chimären liefern den direkten Beweis für die Integration der ES-Zellen durch die Zweifarbigkeit ihres Haarkleides. Die Herstellung chimärer Mäuse fand in Kooperation mit Dr. D. Riethmacher im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg statt.

Die ausgewählten rekombinante ES-Zelllinien wurden aufgetaut und in 3 cm-Schalen auf Feederlayern expandiert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet und mindestens eine Stunde vor Injektion in ES-Zellkulturmedium auf Eis kühl gelagert.

Als Spendertiere der Blastozysten dienten C57BL/6-Weibchen, die mit C57BL/6-Männchen verpaart worden waren. 3,5 Tage p.c. wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri präpariert und von Fett befreit. Die Ovarien wurden am Ovidukt abgetrennt, so daß die Blastozysten mit 1 ml Hepes-gepuffertem Embryonenmedium (M2-Medium; vergleiche HOGAN et al, 1994) aus den Uteri in Blockschälchen herausgespült werden konnten. Die Blastozysten wurden begutachtet, gezählt und mit einer feinen Glaspipette in ungepuffertes Embryonenmedium (M16-Medium; vergleiche HOGAN et al, 1994) überführt. Die Blastozysten wurden bis zur Injektion bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

In der Mikromanipulationsapparatur fand die Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten auf einem Spezialobjetträger aus Messing unter ständiger Kühlung statt. Zehn Blastozysten wurden mit den ES-Zellen in gekühltem M2-Medium vermischt. Nur kleine, glattrandige ES-Zellen mit homogenem Zytoplasma und bevorzugt zusammenhängende Zweiergruppen wurden mit einer feinen Glasinjektionskapillare aufgenommen. Pro Blastozyste erfolgte die Injektion von je 10-15 ES-Zellen. Dazu wurde die Blastozyste mit der Haltekapillare angesaugt und so in Position gedreht, daß der Embryoblast ventral zu liegen kam. Eine dünne Übergangsstelle zwischen zwei Trophoblasten diente zum Einstechen der Injektionskapillare (Abb. 6). Nach erfolgter Injektion wurde das überschüssiger Flüssigkeitsvolumen aus der Blastozyste abgesaugt. Es schloß sich die Inkubation der injizierten Blastozysten bis zur Implantation in M16-Medium bei 37°C und 5% CO₂ an.

Als Ammen wurden scheinträchtige Weibchen der Hybridlinie CBA x C57BL/6 eingesetzt, die 2,5 Tage zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart worden waren. Unter sterilen Bedingungen wurden die Tiere mit 15 µl/g Körpergewicht mit einem Ketamin/Rompun-Gemisch durch intraperitoneale Injektion narkotisiert und anschließend dorso-caudal das Haarkleid entfernt. Im Bereich des Ovar wurde ein Hautschnitt durchgeführt, so daß der rötliche, durch die dorsale Körperwand sichtbare Ovar lokalisiert werden konnte. Über dem Ovar wurde die Bauchhöhle durch eine Schnitt eröffnet und Ovar mit Uterus mit einer Pinzette nach außen gezogen und durch eine Klemme fixiert. Nur wenn die rötlichen Corpora lutei vorhanden waren, die den tatsächlichen Eisprung und damit die Scheinträchtigkeit der Maus anzeigten, erfolgte die Implantation der injizierten Blastozysten. Hierzu wurde unter der Stereolupe die Uteruswand mit einer Kanüle perforiert, so daß durch diesen Kanal 5 Blastozysten mittels einer Glaskapillare in den Uterus eingeführt werden konnten (Abb. 6). Dieser Vorgang wurde für den zweiten Uterusschenkel wiederholt. Die Schnitte in der Körperwand wurden genäht, der Hautschnitt geklammert und durch Jodtinktur desinfiziert.

Ketamin/Rompun-Gemisch: 450 µl Ketamin (Ketanim Gräub, 100mg/ml, Fa. Albrecht) und 50 µl Rompun (Rompum® 2%, FA. Bayer) wurden mit 0,9% isotone Kochsalzlösung (Fa. Braun) auf 5 ml aufgefüllt.

5 Ergebnisse

5. 1 Untersuchungen zur Rolle von Spleißvarianten des murinen Cyclin E1-Gens in der Zellzyklusregulation

5. 1. 1 Expressionsmuster von Cyclin E1 in hepatozellulären Karzinomen der Maus

5. 1. 1. 1 Isolierung der hepatozellulären Karzinome (HCC) nach transgener Expression der Onkogene c-myc und EGF

Durch frühere Untersuchungen ist gezeigt worden, daß die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-myc in humanen und murinen HCC entscheidend zur Entwicklung und Progression von Tumoren beiträgt (PITOT, 1990; GRISHAM, 1996; LUTZ, LEON und EILERS, 2002; NILSSON und CLEVELAND, 2003). In der Mauslinie AAT/c-myc steuert der α_1 -Antitrypsinpromotor die hepatozyten-spezifische Überexpression des murinen c-myc, das die Bildung von HCCs innerhalb von 12-15 Monaten auslöst (DALEMANS et al, 1990; PERRAUD et al, 1991).

Der Wachstumsfaktor EGF stimuliert die Zellteilung von Hepatozyten *in vitro* (HOFFMANN, PIASECKI und PAUL, 1989) und induziert die Zellteilung von Hepatozyten in der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (dargestellt in MICHALOPOULOUS und DeFRANCES, 1997). Analog basiert in der hier verwendeten Mauslinie EGF-2B die Onkogenese auf der Expression einer sekretierbaren Form des humanen EGF. In der Mauslinie EGF-2B steuert der Albumin-Promotor die Expression von EGF. Nach einer Latenzzeit von 9-12 Monaten entwickelt diese transgene Mauslinie HCCs (TÖNJES et al, 1995; STENZEL, 1997; KLOCKE et al, 2002).

Aus zwei transgenen Mäusen der Linie AAT/c-myc wurden insgesamt 11 Tumoren und die zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe isoliert. Diese Tiere wurden aufgrund der Tumorentwicklung im Alter von 9 und 9,5 Monaten getötet. Die Lebergewichte betrugen 7,8 g bzw. 8,0 g, was einem Anteil von 26,2% bzw. 24,5% des Körpergewichts entsprach. Die Tumoren konnten aufgrund ihrer abweichenden Morphologie, Farbe und Konsistenz eindeutig vom nicht-neoplastischen Leberparenchym unterschieden und isoliert werden. Die kleineren Tumoren mit Volumina von bis zu 350 mm³ und Gewichten bis zu 0,28 g besaßen eine kugelige Form, waren zentral solide, von gelblich-rosa Farbe und zeigten keine spezielle Blutgefäßversorgung. C-myc transgene Tumoren mit Volumina von 500-5000 mm³ und Gewichten bis zu maximal 3,8 g waren rot gefärbt, im Querschnitt solide und hatten eine deutlich ausgeprägte spezielle Blutgefäßversorgung (Abb. 7 A).

Die Expression von sekretierbarem, humanem EGF unter Kontrolle des Albuminpromotors führte in der Leber einer 12 Monate alten Maus der Linie EGF-2B zur Bildung von 8 Tumoren, die aus der Leber entnommen wurden. Das absolute Lebergewicht dieses Tieres betrug 5,0 g entsprechend ca. 17,5% des Körpergewichts. Die präparierten

Tumoren wiesen Volumina von ca. 6–700 mm³ bei Gewichten von 0,1–1,2 g auf, hatten zumeist rundlich-ovale Formen und waren weißlich bis rot gefärbt. In den im Querschnitt soliden HCCs war häufig die Bildung deutlich voneinander abgegrenzter Knoten unterschiedlicher Farbe innerhalb eines Tumors festzustellen. Mit der Größenzunahme ging eine steigende Komplexität der Blutgefäßversorgung der Tumoren einher (Abb. 7 B).

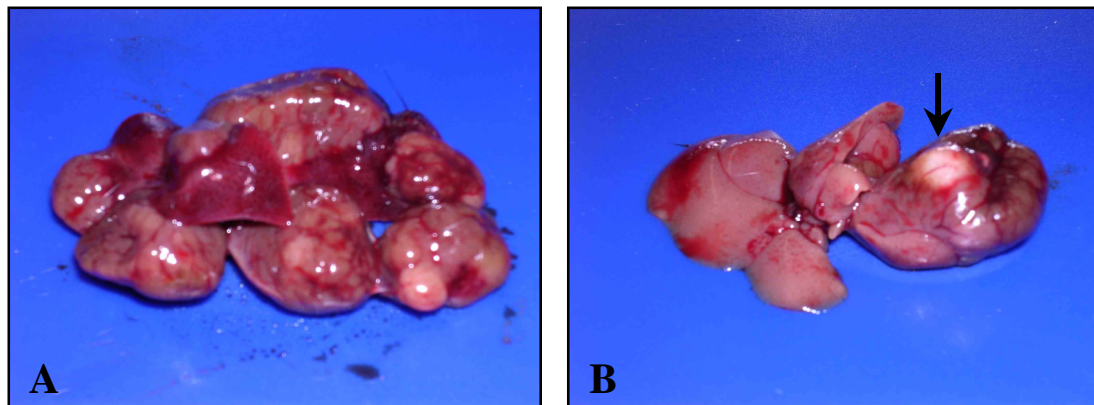


Abbildung 7: Hepatozelluläre Karzinome (HCC) in **A** der Leber einer AAT/c-myc-transgenen Maus und in **B** der Leber einer Alb/IgEGF-transgenen Maus (schwarzer Pfeil)

Aus der Leber einer doppeltransgenen AAT/c-myc-Alb/IgEGF-Maus, die aufgrund der beschleunigten Tumorentwicklung bereits in Alter von ca. 3 Monaten getötet werden mußte, wurden 6 HCCs gewonnen. Durch die Tumorentwicklung hatte die Leber ein Gewicht von ca. 8,1 g und einen Anteil am Körpergewicht von ca. 24,5 %. Die Volumina der Karzinome lagen zwischen 340 und 1500 mm³ bei Gewichten von 0,26–1,2 g. Die Tumoren waren rundlich-oval, von gelb-weißlicher bis roter Färbung und im Querschnitt solide. Mit zunehmender Größe nahm auch die Blutgefäßversorgung zu. Nur im Tumor Nr. 27 war ein zusätzlicher Knoten unterschiedlich differenzierten Gewebes erkennbar.

Genaue Beschreibungen zu den einzelnen Tumoren befinden sich im Anhang 1.

5. 1. 1. 2 Identifizierung von Cyclin E1-cDNA-Isoformen in murinen HCCs

Aus dem Tumorgewebe bzw. dem nicht-tumorösen Lebergewebe, der in Kapitel 5.1.1.1 beschriebenen Proben, wurde Gesamt-RNA isoliert und auf das Vorkommen von alternativ gespleißten cDNAs des murinen Cyclin E1 mittels RT-PCR untersucht. Zu diesem Zweck wurden Primerkombinationen verwendet, die den vollständigen kodierenden Bereich der Wildtyp-cDNA (ccne1 I/ ccne1 II) amplifizierten (Abb. 8A). Daneben kamen Primer zum Einsatz, die den 5'Bereich von Exon 1-Exon 9 (ccne1 I /ccne1 IX) einschlossen (Abb. 8A), da dieser Abschnitt als Schwerpunkt alternativer Spleißvorgänge im humanen Cyclin E1 bekannt ist (SEWING et al, 1994; MUMBERG et al, 1997;

PORTER und KEYOMARSI, 2000). Die primären PCR-Analysen an ausgewählten Tumor-cDNAs mit den genannten Primern ergaben mehrere Produkte, die z.T. kleiner waren als die erwartete Wildtyp-Bande (Abb. 9). Zur weiteren Identifizierung wurden diese PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 T/A-kloniert und anschließend mit M13-Primern sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass neben der Wildtyp-mRNA drei weitere alternativ gespleißte mRNA-Varianten bzw. Isoformen in Tumoren gebildet und im Folgenden beschrieben werden (Abb. 8B):

Die Isoform **IN3** entstand durch eine 31-bp-Insertion am 3'Ende des Exon 2, die aus dem nachfolgenden Intron stammten. Diese Insertion bewirkt eine Verschiebung des offenen Leserahmens, wodurch der Translationsstart vom ATG an Position 39 (Exon 2) auf das ATG an Position 75 (Exon 3) verlagert wurde.

Die Variante **Δ4** zeichnet sich durch das Fehlen des Exon 4 aus, was eine Verkürzung der cDNA um 69 bp auf 1727 bp zu Folge hat, jedoch zu keiner Verschiebung des offenen Leserahmens führt.

Die Isoform **Δ5** entstand durch die Entfernung von Exon 5 aus der mRNA. Dies bewirkte eine Verkürzung der cDNA um 148 bp. Dadurch kommt es zusätzlich zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens. Als erstes, für die Translation von Δ5 nutzbares Start-codon kommt das ATG an Position 390 in Frage.

Eine ausführliche Analyse der Cyclin E1-Spleißprodukte an allen zur Verfügung stehenden Tumormustern ist in Abb. 9 dargestellt. Zunächst wurden die c-myc-transgenen HCCs Nr. 2-8 sowie das zugehörige, nicht-tumoröse Lebergewebe N1 untersucht. Dabei zeigte sich, daß die einzelnen Tumore sehr individuelle Expressionsprofile von Wildtyp, IN3, Δ4 und Δ5 besitzen. Das Kontroll-Lebergewebe N1 zeigte ein gleiches Transkriptionsniveau für die Wildtyp-mRNA, die IN3- und die Δ5-Variante. In Tumor Nr. 6 waren die Wildtyp-, Δ4- und Δ5-Spleißprodukte annähernd in gleicher Menge vorhanden. In den Tumoren Nr. 3, 5 und 7 dominierte die Expression der Wildtyp-mRNA, während andere Cyclin E1-Varianten deutlich schwächer exprimiert wurden. Der Vergleich der c-myc-transgenen Tumoren Nr. 10-13 mit dem zugehörigen nicht-tumorösen Lebergewebe N9 zeigte, daß im Lebergewebe N9, Tumor 12 und 13 die Wildtyp-mRNA und die Isoformen Δ4 und Δ5 relativ gleichmäßig exprimiert wurden. Im Tumor Nr. 10 dominierte dagegen die Wildtyp-mRNA, während der Tumor Nr. 11 nur die Δ5-Variante schwach exprimiert.

Die Untersuchung des Cyclin E1-Expressionsmuster der IgEGF-transgenen HCCs ergab, daß die Wildtyp-Isoform in fast allen Tumoren am höchsten exprimiert wurde, während die mRNA-Formen Δ4 und Δ5 deutlich geringer vertreten waren. Ausnahmen bildeten nur der Tumor Nr. 14 mit gleichmäßiger Expression der Varianten Wildtyp, Δ4 und Δ5 und der Tumor Nr. 21, bei dem kein Cyclin E1 nachzuweisen war.

Die PCR-Analyse der c-myc/EGF-doppeltransgenen HCCs demonstrierte, daß in diesen Tumoren das im Vergleich höchste absolute Expressionsniveau für Cyclin E1 vorhanden war und das zudem fast ausschließlich die Wildtyp-mRNA gebildet wurde. Nur der Tumor Nr. 22 exprimiert detektierbare Mengen der Varianten Δ4 und Δ5.

Die Ergebnisse der Expressionanalyse verdeutlichen, daß eine Korrelation von Tumorgröße- oder Morphologie zum Expressionsprofil der Cyclin E1-Varianten nicht festzustellen war. Allerdings ergab sich eine Korrelation aus Tumorwachstumsgeschwindigkeit und Expression der Wildtyp-Isoform: Während in den langsam wachsenden c-myc-transgenen HCCs neben der Wildtyp-mRNA auch die $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ -Isoformen vermehrt auftraten, war die beschleunigte Tumorprogression der IgEGF-transgenen HCCs bereits mit einer verstärkten Expression der Wildtyp-mRNA assoziiert. Die schnell wachsenden HCCs in den doppeltransgenen Tieren exprimieren ausschließlich die Wildtyp-Variante der Cyclin E1-mRNA. Die Beschleunigung der Tumorprogression geht mit einer deutlichen Verschiebung des Expressionsmusters von den verkürzten Varianten zur Wildtyp-Form von Cyclin E1 einher.

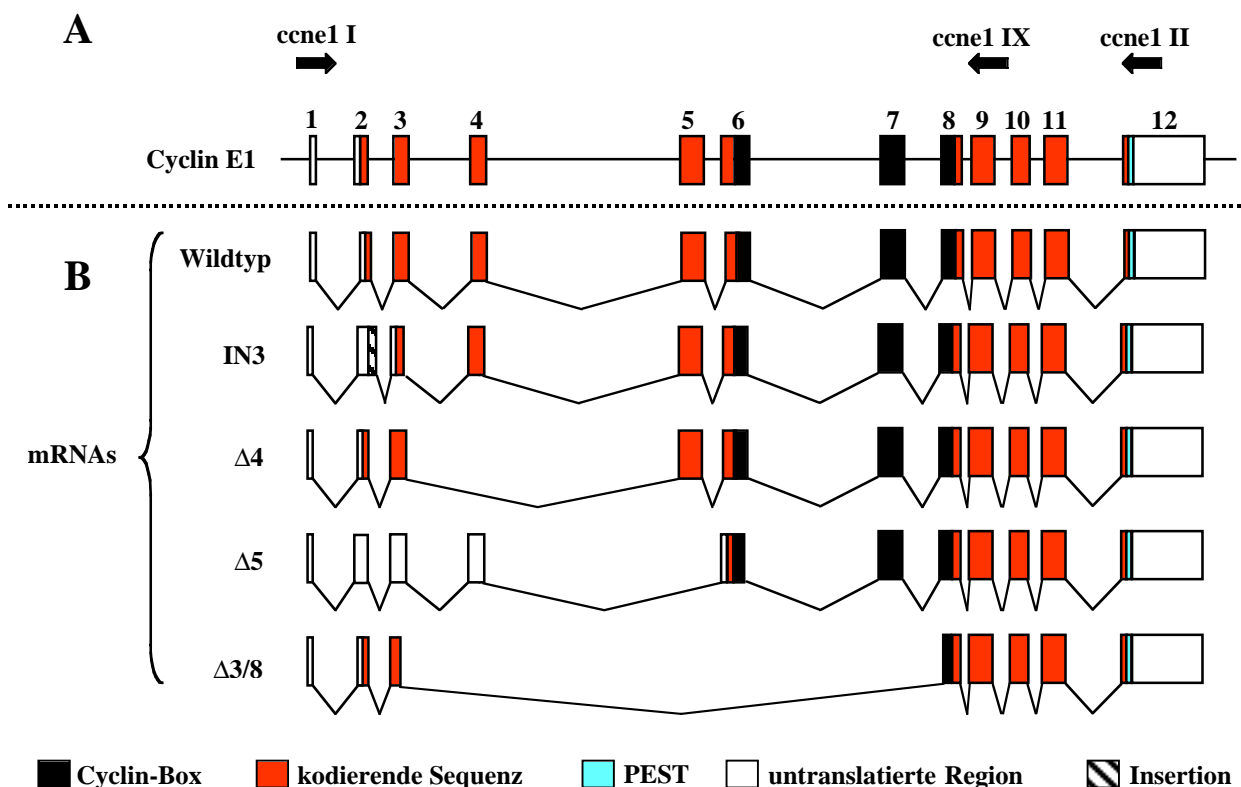


Abbildung 8: Schematische Darstellung der alternativ gespleißten mRNA-Isoformen des Cyclin E1-Gens der Maus. **A** Das murine Cyclin E1-Gen ist auf genomischer Ebene in 12 Exons unterteilt. Die alternativ gespleißten Isoformen wurden mit den Primerkombinationen ccne1 I/ccne1 IX sowie ccne1 I/ccne1 II mittels RT-PCR nachgewiesen. **B** Durch alternative Spleißvorgänge entstehen neben der **Wildtyp**-mRNA, die alle 12 Exons enthält, drei weitere Isoformen. **IN3** beinhaltet eine 31 bp-Insertion hinter Exon 2, so daß der offene Leserahmen zu einem ATG in Exon 3 verschoben wird. Bei den Varianten **$\Delta 4$** und **$\Delta 5$** gingen jeweils die Exons 4 bzw. 5 verloren, was bei **$\Delta 5$** zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens zu einem Translationsstart in Exon 6 führte. Wie auch bei **$\Delta 4$** verursacht der Verlust der kodierenden Sequenz von Mitte Exon 3 bis zur Mitte Exon 8 bei der Variante **$\Delta 3/8$** keine Verschiebung des offenen Leserahmens.

5. 1. 2 Analysen zur Expression von Cyclin E1-Varianten in murinen Hepatozyten in G0 und nach partieller Hepatektomie

Die Expressionsmuster von Cyclin E1-Varianten in HCCs zeigten, daß das Vorkommen bestimmter Cyclin E1-Spleißvarianten mit der Beschleunigung der Zellzyklusprogression korreliert. Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die erhöhte Expression der Wildtyp-Form der Cyclin E1-mRNA die Proliferation von Hepatozyten beschleunigt, während die Expression verkürzter Isoformen mit einer verringerten Proliferationsrate assoziiert ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden Untersuchungen der Cyclin E1-Expressionmuster in Lebern adulter Mäuse und an Lebergeweben nach partieller Hepatektomie durchgeführt. In unbehandelten Lebern adulter Wildtyp-Mäuse befinden sich die Hepatozyten außerhalb des Zellzyklus in der G0-Phase, in der keine Zellteilungen stattfinden (COOPER, 2003). Durch partielle Hepatektomie, die 2/3 der Lebermasse der Maus entfernt, werden 95% der verbleibenden Hepatozyten angeregt, aus dem G0-Zustand wieder in den Zellzyklus einzutreten, um den Gewebeverlust der Leber auszugleichen (EHRENFRIED et al, 1997; MICHALOPOULOS und DeFRANCES, 1997; KITAMURA, WATANABE und SATO, 1998).

Aus Lebern von unbehandelten Mäusen der Inzuchtstämme C57BL/6, C3H, 129SV, DBA/2 und BALB/c wurde Gesamt-RNA gewonnen und mittels RT-PCR analog zu den HCCs (Kapitel 5.1.1.2; Abb. 8) auf des Vorkommen von Cyclin E1-Isoformen analysiert (Abb. 10). Diese Experimente zeigten, daß in unbehandelten Lebern mit geringer Proliferation kein bzw. wenig Wildtyp-Cyclin E1-mRNA im Vergleich zum Tumorgewebe Nr. 24 prozessiert wird. Dagegen wurde die neue, bisher unbekannte Form $\Delta 3/8$ der Cyclin E1-mRNA entdeckt, die in den untersuchten G0-Lebern ausschließlich (C57BL/6, C3H, BALB/c) oder deutlich höher als die Wildtyp-Form (129SV, DBA/2) exprimiert wurde (Abb. 10A). Klonierung und Sequenzierung dieser neuartigen Isoform $\Delta 3/8$ ergaben, daß es sich um eine alternativ gespleißte mRNA handelt, der 594 bp zwischen Position 88 in Exon 3 und Position 682 in Exon 8 fehlen. Diese Deletion eliminiert den zentralen Teil der Wildtyp-mRNA mit der Cyclin-Box (KOFF et al, 1991; LEW, DULIC und REED, 1991) und dem nukleären Lokalisationssignal (MOORE, KORNBLUTH und HUNT, 2002) ohne den offenen Leserahmen zu verschieben. Beginnend mit dem ATG in Position 39 sollte daher ein verkürztes Protein mit errechneten 27 kDA Molekulargewicht gebildet werden können (Abb. 9).

Analog wurden die RT-PCR-Untersuchung zum Auftreten von Cyclin E1-Spleißvarianten in Hepatozyten nach partieller Hepatektomie (PH) durchgeführt. Diese Experimente basieren auf Gesamt-RNA-Extrakten, die freundlicherweise von Dr. Torsten Wüstefeld zur Verfügung gestellt wurden. In Abb. 10B ist dargestellt, daß die $\Delta 3/8$ -Variante in der unbehandelten Leber vor PH deutlich stärker exprimiert wurde als die Wildtyp-cDNA von Cyclin E1. Zwischen 4 Stunden und 36 Stunden post PH stieg das Expressionsniveau der Cyclin E1-Wildtyp-mRNA deutlich an, während zugleich die Transkription der $\Delta 3/8$ -Isoform schrittweise reduziert wurde. Zum Zeitpunkt 72 Stunden post PH war wieder eine signifikante Verminderung der Transkription der Cyclin E1-Wildtyp-mRNA eingetreten, die von einem gegenläufigen Anstieg der Expression der $\Delta 3/8$ -Variante begleitet wurde.

Die Ergebnisse belegen, daß eine weitere, alternativ gespleißte Variante $\Delta 3/8$ der Cyclin E1-mRNA existiert, die vornehmlich in der G0-Phase von Hepatozyten exprimiert wird. Nach partieller Hepatektomie wird der Wiedereintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus von einer Verschiebung des Expressionsprofils zugunsten der Wildtyp-Form der Cyclin E1-mRNA begleitet. Mit Beendigung der Leberregeneration (72h) dominiert dagegen wieder die Expression der $\Delta 3/8$ -Variante. Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass die $\Delta 3/8$ -Variante von Cyclin E1 eine hemmende Wirkung auf den Eintritt von Hepatozyten in den Zellzyklus hat und möglicherweise an der Aufrechterhaltung des G0-Zustands beteiligt ist.

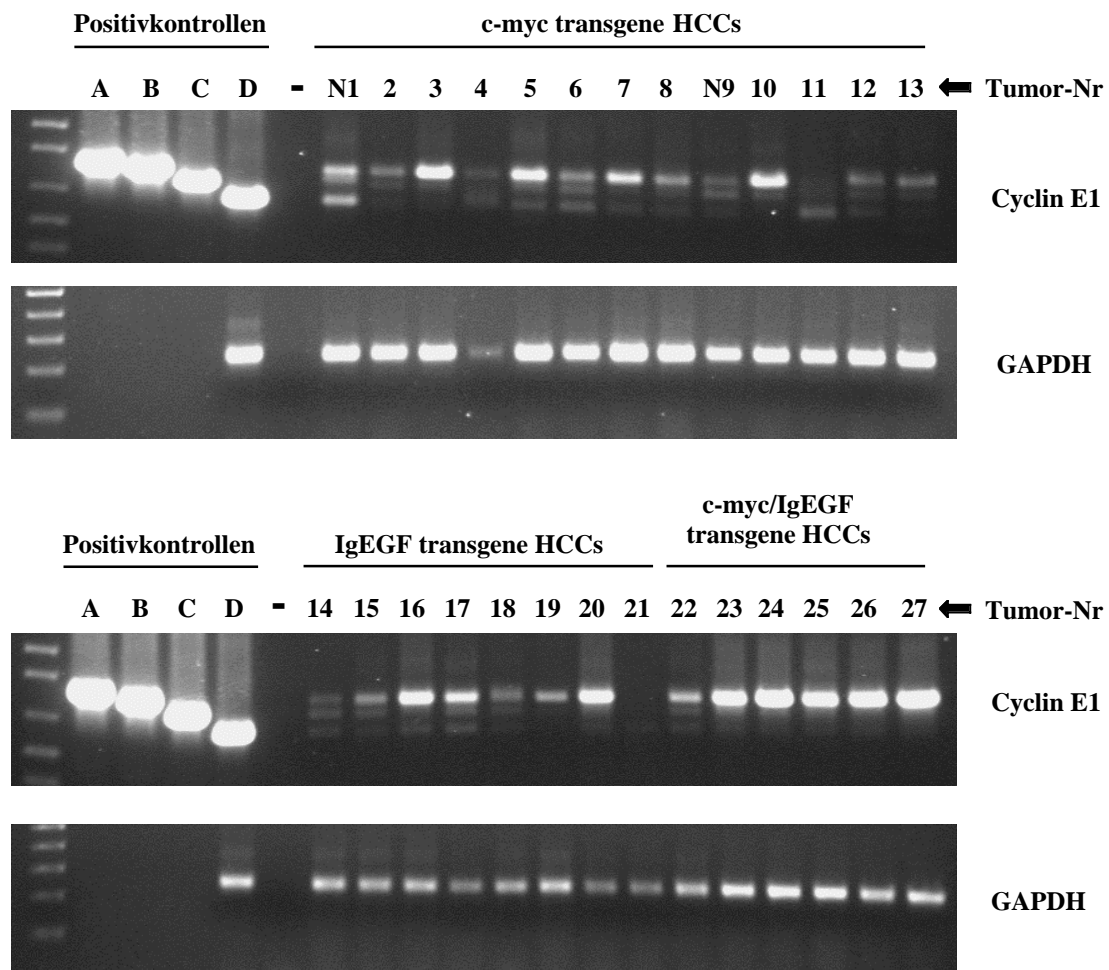


Abbildung 9: RT-PCR-Analyse der Expressionsprofile von Cyclin E1 in hepatozellulären Karzinomen (HCC) aus c-myc, IgEGF oder doppeltransgenen Mäusen. Es wurden die Primer ccne1 I/ccne1 II in der PCR verwendet (vergleiche Abb. 6); cDNAs der Cyclin E1-Isoformen im Vektor pCR2.1 dienen als Positivkontrollen: **A** IN3, **B** Wildtyp, **C** $\Delta 4$, **D** $\Delta 5$; **N**: nicht-neoplastisches, transgenes Lebergewebe; **-**: Negativkontrolle. Die cDNA von GAPDH als Housekeeping-Gen wurde amplifiziert, um die Qualität der eingesetzten RNA und die gleichmäßige Effizienz der RT-Reaktion zu verifizieren.

5. 1. 3 Untersuchungen zur Transkription und Translation von Cyclin E1-Isoformen *in vitro*

Um die Frage zu klären, ob die Cyclin E1-mRNA-Isoformen IN3, $\Delta 4$, $\Delta 5$ und $\Delta 3/8$ auch in Proteine translatiert werden, sollten die cDNA-Varianten und der Wildtyp-cDNA in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Zunächst wurden die Cyclin E1-Varianten mittels PCR mit den Primern *ccneI HindIII /ccneI NotI*, an die die zur späteren Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen angehängt worden waren, mit Proofreading-Taq-Polymerase aus dem Vektor pCR2.1, in den die cDNA zur Konservierung kloniert worden waren, amplifiziert. Über die *NotI*- und *HindIII*-Schnittstellen wurden die resultierenden cDNAs dann so in den Expressionsvektor pcDNA4/TO/myc-His C (Fa. Invitrogen) ligiert, das dadurch die cDNAs "in frame" mit einem 3'-Myc-Epitop fusioniert wurden. Die korrekte Insertion in den Expressionsvektor wurde durch Sequenzierung mit dem spezifischen Primer *BGH reverse* bestätigt.

Die Expressionsplasmide pcDNA4/TO/myc-His C, die für die Cyclin E1/Myc-Varianten oder den Cyclin E1/Myc-Wildtyp kodierten, und pBluescript als Negativkontrolle wurden jeweils mit der Calciumphosphat-Methode (CHEN und OKAYAMA, 1987) in Huh7-Zellen transfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden mit jedem Transfektionsansatz zusätzlich 0,5 μ g CMVLacZ-Reporterplasmid co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden zur Isolation von Gesamt-RNA 24 Stunden nach Transfektion geerntet. Parallel wurden Proteinextrakte zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und für Western Blot-Analysen hergestellt.

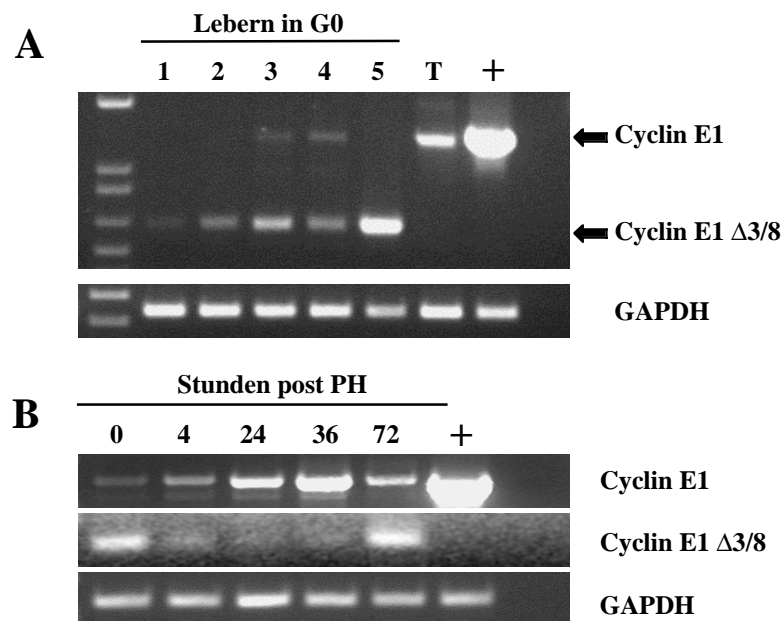


Abbildung 10: RT-PCR-Analyse der Expressionsprofile von Cyclin E1. **A** in G0-Lebern von Mäusen folgender Inzuchtstämme: 1 C57BL/6, 2 C3H, 3 129SV, 4 DBA/2, 5 BALB/c; T: c-myc/IgEGF transgener Tumor Nr. 24. **B** in murinem Lebergewebe vor und 4 Stunden bis 72 Stunden nach partieller Hepatektomie (PH); +: pCR2.1-Cyclin E1-Wildtyp als Positivkontrolle; -: Negativkontrolle. Die cDNA von GAPDH als Housekeeping-Gen wurde amplifiziert, um die Qualität der eingesetzten RNA und die gleichmäßige Effizienz der RT-Reaktion zu verifizieren.

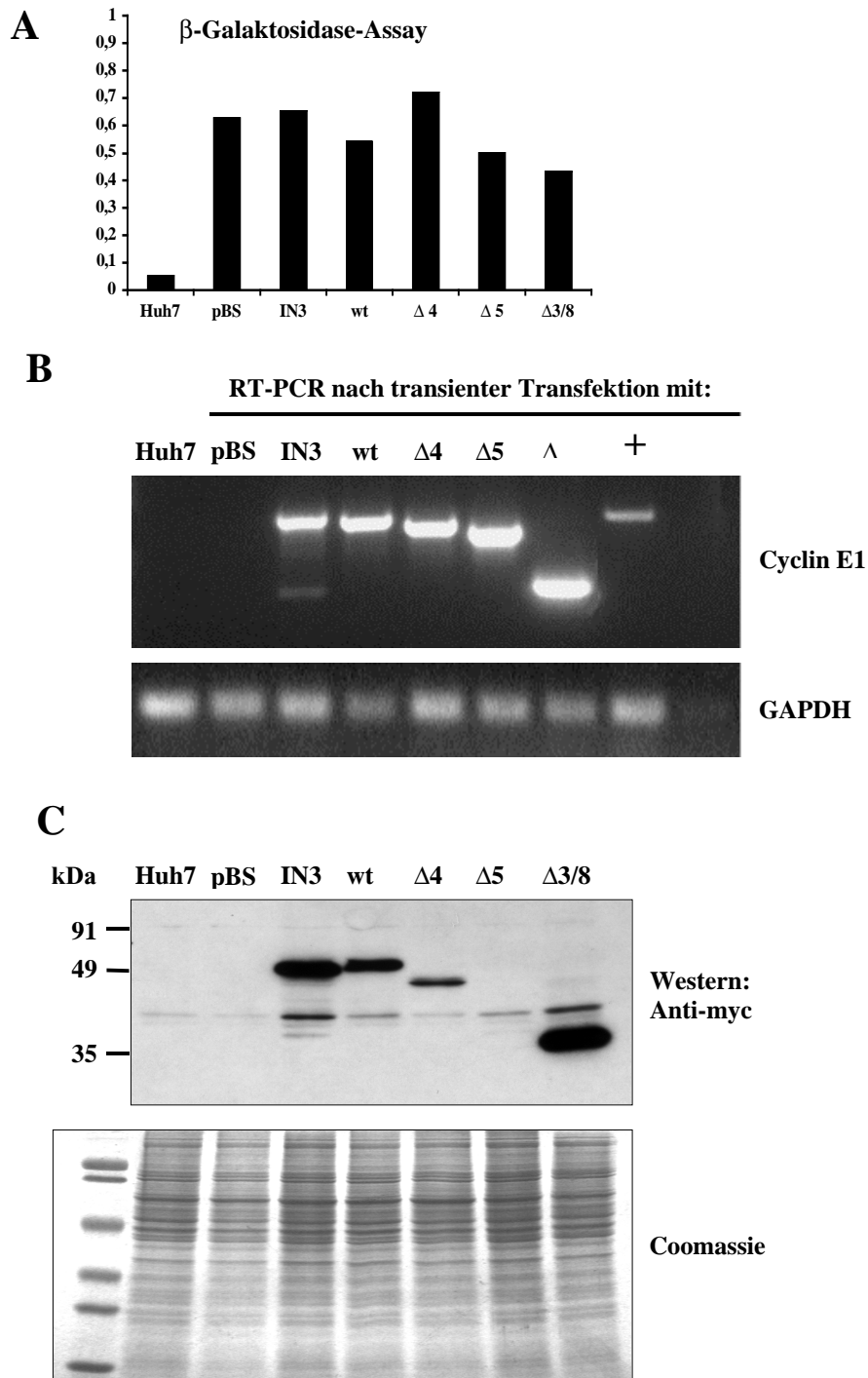


Abbildung 11: Analyse der Transkription und Translation der Cyclin E1-Spleißvarianten nach transienter Transfektion in Huh7-Zellen. A 0,5 μ g CMVLacZ-Plasmid wurden jeweils den Transfektionsansätzen zugefügt und ein β -Galaktosidase-Assay zur Kontrolle der Transfektionseffizienz durchgeführt. Zellen nach Transfektion von pBluescript und untransfizierte Huh7-Zellen dienten als Negativkontrollen. B RT-PCR-Analyse der Expression der Cyclin E1-Varianten und von GAPDH als Housekeeping-Gen; +: RT von Gesamt-RNA aus der Milz C Western Blot-Analyse zum Translationsniveau der Cyclin E1-Isoformen als Myc-Fusionsproteine. Die Coomassie-Färbung des SDS-Page-Gels belegte den Einsatz gleicher Proteinmengen.

Der durchgeführte β -Galaktosidase-Assay zeigte eine ausreichende und homogene Transfektionseffizienz für alle transfizierten Expressionsplasmide und pBlueskript (Abb. 11A). Der Nachweis der Transkription der Cyclin E1-Varianten und des Wildtyps erfolgte durch RT-PCR mit den Primern *ccne1 I/Myc-Epitop*, die spezifisch nur die exogen exprimierten Cyclin E1/Myc-cDNAs detektieren und endogenes Cyclin E1 nicht amplifizieren können. In Abb. 11B ist gezeigt, daß alle Cyclin E1-Varianten und der Wildtyp korrekt und in annähernd gleicher Menge transkribiert wurden, während die RT-PCRs für die als Negativkontrollen eingesetzten pBS-transfizierten und untransfizierten Huh7-Zellen kein Signal ergaben. Als Positivkontrolle und Größenvergleich wurde eine RT-PCR für endogenes Cyclin E1 mit muriner Milz-RNA durchgeführt, die eine Wildtyp-Cyclin E1-Bande in annähernd gleicher Größe zum CyclinE1/Myc-Wildtyp ergab.

Auf Proteinebene erlaubte der c-terminalen Myc-Anteil der Cyclin E1/Myc-Fusionsproteine selektiv die Detektion der eingebrachten Cyclin E1-Proteine durch Verwendung eines c-myc-spezifischen Antikörpers. Mit diesem Antikörper wurden Western-Blot-Analysen der Proteinextrakte aus den transfizierten und untransfizierten Huh7-Zellen durchgeführt (Abb. 11C). Die Negativkontrolle belegte, daß nur sehr wenige unspezifische Bindungen des Antikörpers an Proteine stattfanden. Weiterhin ergab die Auswertung, daß der Cyclin E1-Wildtyp sowie die IN3- und Δ 4-Varianten in Proteine von 47 kDa, 45 kDa bzw. 44 kDa translatiert wurden. Auch die Δ 3/8-Isoform wurde in ein Protein mit 27 kDa Molekulargewicht translatiert. Für die Δ 5-Variante konnte keine Translation nachgewiesen werden (Abb. 11C).

5. 1. 4 Analysen zur Proteinfunktion der Cyclin E1-Isoformen in vitro

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die translatierten Cyclin E1-Varianten Komplexe mit der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (cdk2), dem natürlichen Bindungspartner von Cyclin E1, bilden. Zudem sollte untersucht werden, ob Komplexe von cdk2 mit den Proteinen der Cyclin E1-Isoformen in der Lage sind, Histon H1, eines der wichtigsten natürlichen Substrate der Cyclin E1-cdk2-Komplexe (CONTRERAS et al, 2003), zu phosphorylieren. Dazu wurden die Proteine der Cyclin E1-Isoformen IN3, Δ 4 und Δ 3/8 im Koimmunpräzipitationsexperiment und anschließend Histon H1-Kinase-Assay auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft.

Huh7-Zellen wurden erneut mit den pcDNA/TO/myc-His C-Plasmiden, die für Myc-Fusionsproteine von Wildtyp-Cyclin E1, IN3, Δ 4, Δ 5 und Δ 3/8 kodierten, transient transfiziert. Die Translation der Cyclin E1-Varianten wurde im Western Blot mit dem entsprechenden Antikörper gegen das myc-Epitop überprüft (Abb. 12A). Diese Untersuchung ergab, daß die Proteine für IN3, Wildtyp-Cyclin E1, Δ 4 und Δ 3/8 effizient translatiert wurden. In den Proteinextrakten der mit IN3 und Δ 5 transfizierten Zellen wurde in geringer Menge ein Protein nachgewiesen, dessen Molekulargewicht annähernd den errechneten 33 kDa für das Δ 5-Protein entsprach.

In einem parallelen Western Blot-Nachweis wurde die Expression der humanen Cdk2 untersucht. Dieses Experiment ergab eine gleichmäßige Expression des Cdk2-Proteins in allen untersuchten Proteinextrakten (Abb. 12A, unterer Teil).

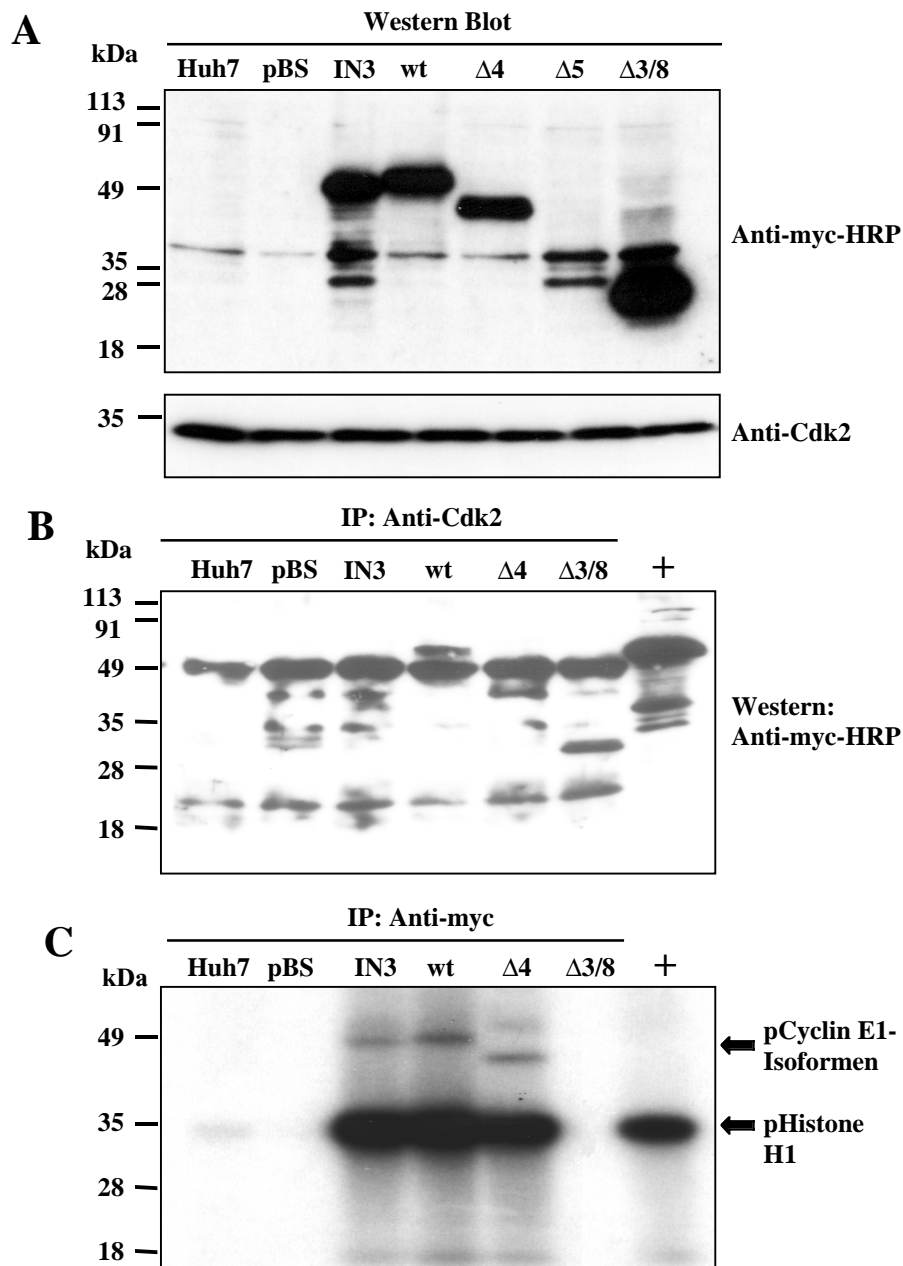


Abbildung 12: Analyse der Funktion von Cyclin E1-Varianten nach transientscher Transfektion in Huh7-Zellen. **A** Die Myc-Fusionsproteine der Cyclin E1-Isoformen IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 3/8$ sowie des Wildtyp-Cyclin E1 waren im Western Blot nachweisbar; humanes Cdk2 wurde konstitutiv translatiert. **B** Mit einem anti-cdk2-Antikörper wurden Komplexe von Cdk2 mit Proteinen des Wildtyp-Cyclin E1 und der Cyclin E1-Varianten IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 3/8$ präzipitiert. Als Positivkontrolle diente nicht-präzipitiertes Cyclin E1/Myc-Fusionsprotein. **C** Nur mit IN3, $\Delta 4$ und dem Wildtyp-Cyclin E1-Protein bildete cdk2 Komplexe, die in der Lage waren, das Histone H1-Protein zu phosphorylieren; +:als Kontrolle wurden die Cdk2-Komplexe aus Kernextrakten, die aus muriner Leber 72 Stunden nach PH stammten, mit einem Cdk2-Antikörper gefällt.

Aus Proteinextrakten, in denen die Proteine der Cyclin E1-Varianten und Cdk2 in ausreichender Menge nachzuweisen waren, wurden durch Koimmunopräzipitation mit einem entsprechenden Cdk2-bindenden Antikörper die Cdk2-Cyclin E-Komplexe unter nicht-denaaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die angereicherten Cdk2-Komplexe wurden anschließend einer Western Blot-Analyse mit dem entsprechenden Antikörper für das Myc-Epitop der Cyclin E1/Myc-Fusionsproteine unterzogen (Abb 12, B). Dieses Experiment belegte, daß sowohl das Wildtyp-Cyclin E1-Protein als auch die $\Delta 4$ - und IN3-Proteine mit cdk2 interagieren. Der Western Blot zeigte zudem, daß überraschenderweise auch das stark verkürzte $\Delta 3/8$ -Protein an Cdk2 bindet.

Die Aktivität der Komplexe von humanen Cdk2 mit den Proteinen der Cyclin E1-Varianten wurde in einem Histon H1-Kinase Assay untersucht. Unter nicht-denaaturierenden Bedingungen wurden immunopräzipitierte Cyclin E1/myc-Cdk2-Komplexe mit dem Histon H1-Protein und radioaktivem γ -ATP unter entsprechenden Puffer- und Temperaturbedingungen inkubiert. Wurde das Cdk2-Protein durch die Komplexbildung mit den Proteinen der Cyclin E1-Varianten aktiviert, so katalysiert die Kinase die Übertragung einer radioaktiven Phosphatgruppe auf das Histon H1-Protein. Die Auswertung dieses Experiments (Abb. 12C) ergab, daß das Histon H1 von Cdk2-Komplexen phosphoryliert wurde, die das Wildtyp-Cyclin E1 oder die Proteine von IN3 oder $\Delta 4$ enthielten. Wildtyp-Cyclin E1, IN3 und $\Delta 4$ wurden zudem autophosphoryliert (Abb 12C). Die Autophosphorylierung des Cyclin E1-Proteins am Threonin 380 sowie Serin 384 ist eine essentielle Voraussetzung für die Degradation von Cyclin E1 über den Ubiquitin-Proteasom-Mechanismus (WON und REED, 1996; WELCKER et al, 2003). Der in Abb. 12c dokumentierte Nachweis der autophosphorylierten Proteine der Cyclin E1-Isoformen bestätigt zu einem, daß die Myc-Fusionsproteine der Cyclin E1-Isoformen voll funktionsfähig sind. Zum anderen wird belegt, daß homogene Mengen der jeweiligen Cyclin E1/cdk2-Komplexe immunopräzipitiert wurden und zeigen zudem die hohe Sensitivität des Kinase-Assays. Die Komplexe von Cdk2 mit dem $\Delta 3/8$ -Protein waren dagegen inaktiv, so daß keine Phosphorylierung von Histon H1 stattfand (Abb. 12C).

Die dargestellten Experimente belegen, daß sowohl das Wildtyp-Cyclin E1 als auch die Proteine der Isoformen IN3 und $\Delta 4$ nach transienter Transfektion in Huh7-Zellen aktive Komplexe mit humanen Cdk2 bilden, die in der Lage sind Histon H1 und sich selbst zu phosphorylieren. Das $\Delta 3/8$ -Protein bindet ebenfalls an Cdk2. Die entstehenden $\Delta 3/8$ -Cdk2-Komplexe waren jedoch inaktiv, da keine Phosphorylierung von Histon H1 im hoch sensitiven Kinase-Assay nachweisbar war.

5. 1. 5 Untersuchungen zum Einfluß der Cyclin E1-Variante $\Delta 3/8$ auf die G0-G1-Transition *in vitro*

5. 1. 5.1 Etablierung stabiler Zelllinien zur Expression von Wildtyp-Cyclin E1 und $\Delta 3/8$

Weiteren Aufschluß über die Funktion von Wildtyp-Cyclin E1 im Vergleich zur $\Delta 3/8$ -Isoform sollten Versuche zur G0-G1-Zellzyklustransition erbringen. Dazu sollten stabile Zelllinien generiert werden, die eine Cyclin E1-Variante ($\Delta 3/8$ oder Wildtyp)

exprimierten und zugleich in der G1-Phase des Zellzyklus leicht arretierbar waren. Zu diesem Zweck wurden murine embryonale Fibroblasten der Linie NIH/3T3 ausgewählt. Zur stabilen Transfektion wurde der Expressionssystem T-Rex (Fa. Invitrogen) eingesetzt, dessen Expressionsvektor pcDNA/TO/myc-His C eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt. Vorversuche zur Antibiotikatoleranz zeigten, daß die Selektion mit 1 mg/ml Zeocin zur sicheren Eliminierung aller nicht-transfizierten NIH/3T3-Zellen führt.

Die Expressionsplasmide pcDNA/TO/myc-His C/E1 und pcDNA/TO/myc-His C/ Δ 3/8, die für Myc-Fusionsproteine von Wildtyp-Cyclin E1 und Δ 3/8 kodierten, wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Polyfect (Fa. Qiagen) in NIH/3T3-Zellen transfiziert. Nach 10tägiger Selektion mit Zeocin hatten sich stabil transfizierte Zelllinien etabliert, in denen mittels RT-PCR und Western Blot die Expression des Wildtyp-Cyclin E1 und der Δ 3/8-Isoform nachgewiesen wurde (Abb. 13).

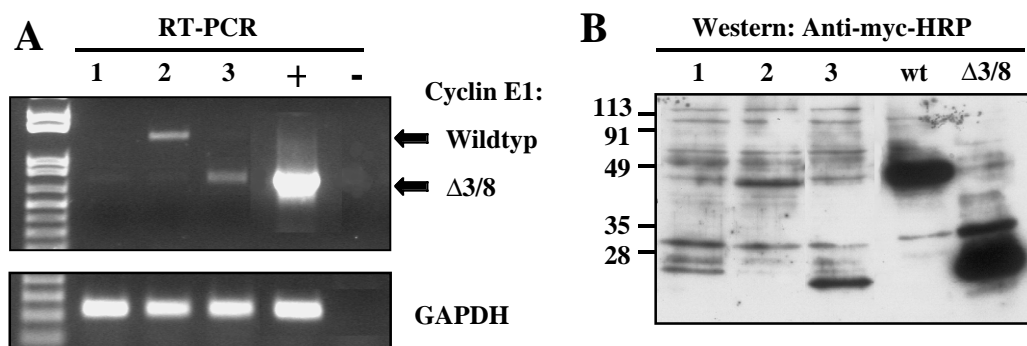


Abbildung 13: Nachweis der Expression von Wildtyp-Cyclin E1 und Δ 3/8 in stabil-transfizierten NIH/3T3-Zellen. A RT-PCR mit den Primern ccne1cDNAforward/Myc-Epitop: 1 untransfizierte NIH/3T3, 2 Wildtyp-Cyclin E1/Myc, 3 Δ 3/8-/Myc; +: Plasmid pcDNA/TO/myc-His C/ Δ 3/8 als Positivkontrolle; -: Negativkontrolle. B Western Blot-Nachweis: 1 untransfizierte NIH/3T3, 2 Wildtyp-Cyclin E1/Myc, 3 Δ 3/8-/Myc; wt und Δ 3/8: Positivkontrollen

5.1.5.2 Vergleichende FACS-Analyse zum Einfluß von Δ 3/8 auf den Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus nach G1-Arrest

NIH/3T3-Zellen, die stabil das Wildtyp-Cyclin E1-Protein (E1-Zellen) oder das Protein der Δ 3/8-Variante (Δ 3/8-Zellen) exprimierten, wurden in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät, so daß die Schalen zu Beginn des Experiments ca. 50% konfluent waren. Untransfizierte NIH/3T3-Zellen dienten als Kontrollen. Unter ständigem Selektionsdruck durch Zeocin erfolgte ein Serumentzug über 48 Stunden, um die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Anschließend wurden die Zellen mit serumhaltigem Medium versorgt. Der dadurch angeregte Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus wurde über 24 Stunden anhand der Veränderungen der Zellmorphologie verfolgt und dokumentiert. Außerdem wurden Zellen vor Beginn des Serumentzugs, im G1-Arrest und zu den Zeitpunkten 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden nach Beginn der Serumstimulation geerntet.

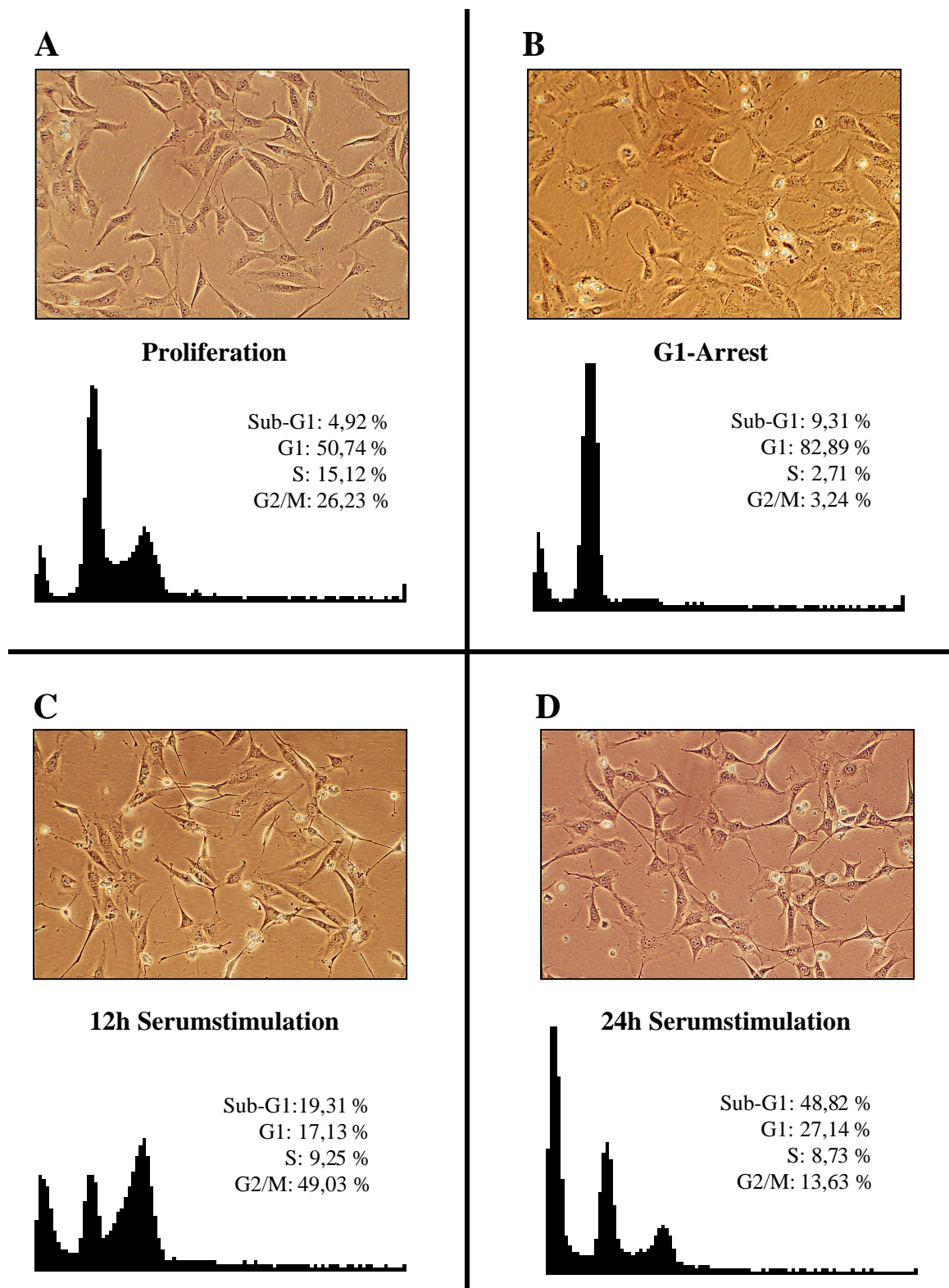


Abbildung 14: Morphologische Veränderungen und FACS-Analysen an NIH3T3- Zellen. A: Proliferation, B: G1-Arrest durch Serumentzug sowie C und D: Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Serumstimulation

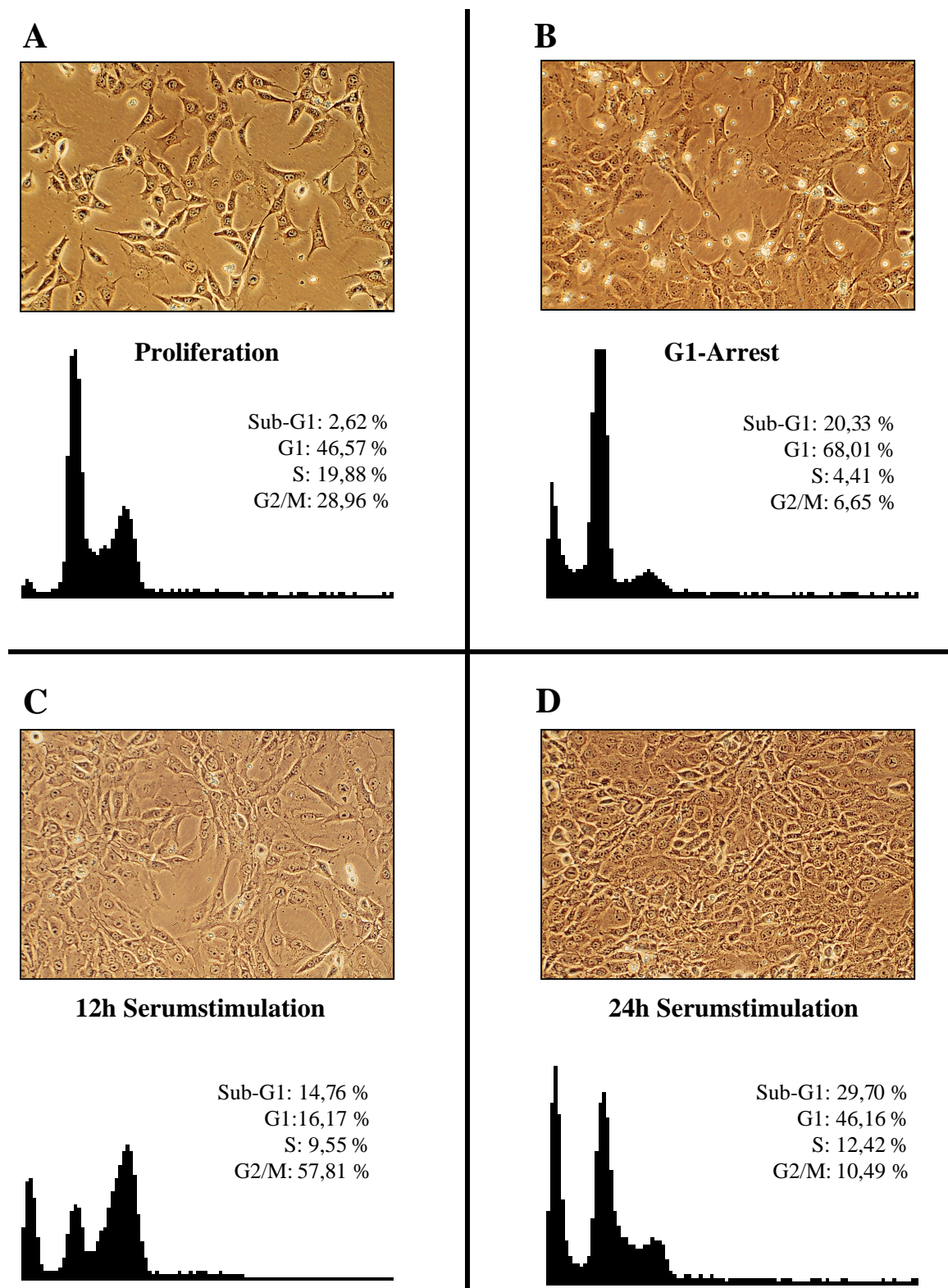


Abbildung 15: Morphologische Veränderungen und FACS-Analysen an E1-Zellen. A: Proliferation, **B:** G1-Arrest durch Serumentzug sowie **C** und **D:** Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Serumstimulation

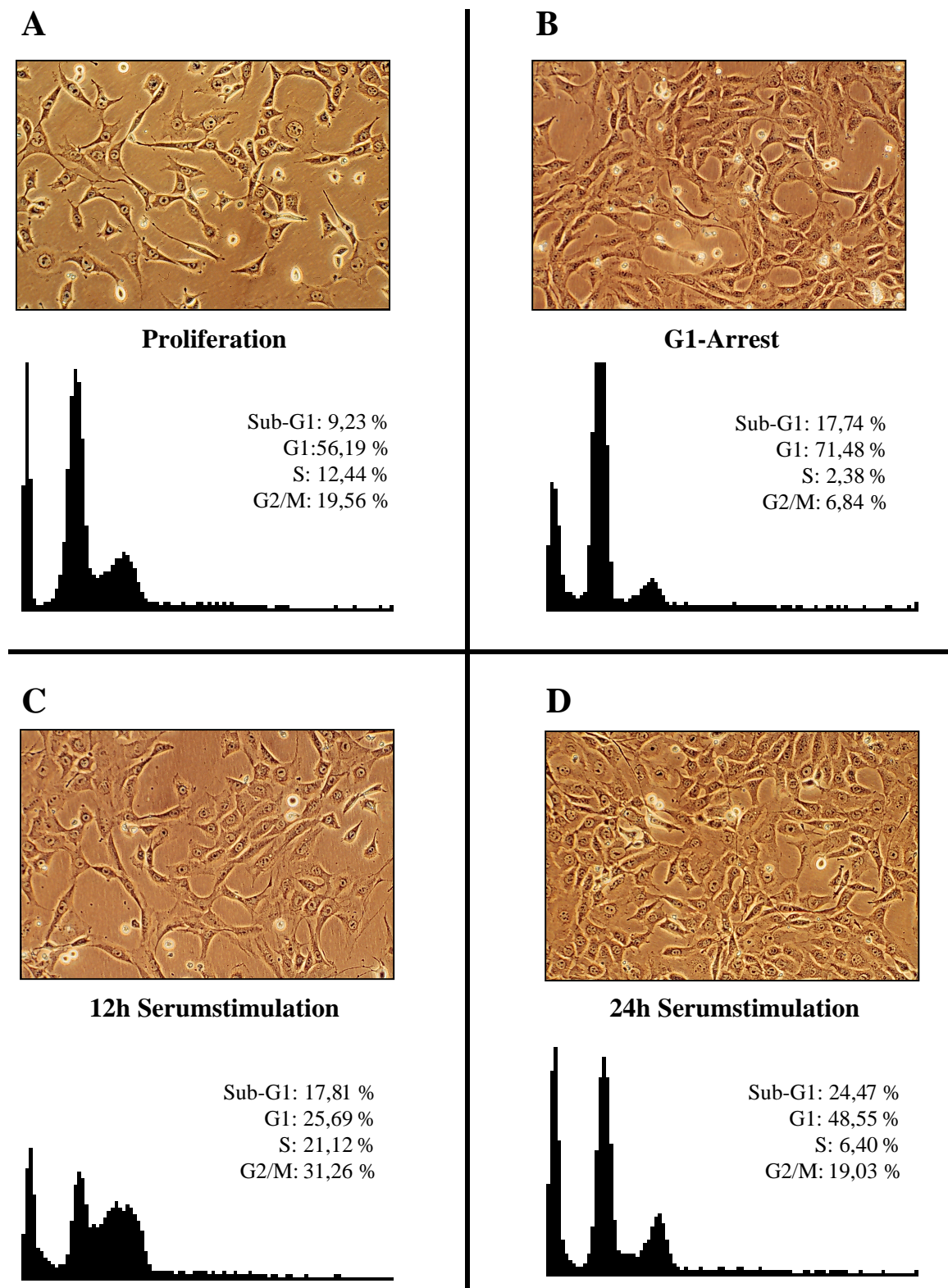


Abbildung 16: Morphologische Veränderungen und FACS-Analysen an $\Delta 3/8$ -Zelle. A Proliferation, B: G1-Arrest durch Serumentzug sowie C und D: Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Serumstimulation

An diesen Zellen wurden die Veränderungen des DNA-Gehalt mittels Propidium-Iodid-Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt, die eine Darstellung der Verteilung der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus in Form von Histogrammen ermöglichte. Zusätzlich erfolgte auch die Quantifizierung der Zellen mit einem Sub-G1-Gehalt an DNA.

Proliferation: Zellen vor Beginn des Serumentzugs

Zu Beginn des Experiments bedeckten die Zellen aller Linien annähernd die Hälfte der Fläche der Zellkulturschalen (Abb. 14A, 15A, 16A). Die Zellen hatten optimale Wachstumsbedingungen mit geringer Kontaktinhibition. Zu diesem Zeitpunkt besaßen die NIH/3T3-Zellen die für Fibroblasten typische spindelige bis dreieckige Form mit unregelmäßigen Zellausläufern. Der große Zellkern hatte eine ovale Form, war hell und beinhaltete ein bis zwei Nukleoli. Der Zellkern war von granuliertem Zytoplasma umgeben. Das Erscheinungsbild der Zellen der Linien E1 und die $\Delta 3/8$ wies insofern von dem der NIH/3T3-Zellen ab, als die E1- und $\Delta 3/8$ -Zellen eine stärker kubische bis mehreckige Form aufwiesen. Zudem erschien das Zytoplasma beider Zelllinien durch einen höheren Anteil an Zellorganellen und Granula dunkler gefärbt.

Die Bestimmung der Verteilung der Zellen im Zellzyklus mittels FACS-Analyse ergab, daß ca. 50% der NIH/3T3 vor Beginn des Serumentzug in der G1-Phase waren, während ca. 15% in der S-Phase und ca. 26% in die G2/M-Phase eingetreten waren. Bei den Zellen, die zusätzlich den Cyclin E1-Wildtyp exprimierten war eine leichte Verschiebung festzustellen, da sich hier bereits ca. 20% der Zellen in der S- und ca. 29% in der G2/M-Phase befanden. Nur ca. 46% der E1-Zellen hatten einen für die G1-Phase charakteristischen DNA-Gehalt von 2N. Bei den $\Delta 3/8$ -Zellen dagegen zeigte sich, daß mit ca. 56% der Zellen ein deutlich größerer Anteil in der G1-Phase zu finden war als bei NIH/3T3 oder E1-Zellen; nur ca. 12% waren der S-Phase und ca. 20% der G2/M-Phase zuzurechnen. In der $\Delta 3/8$ -Zelllinie wiesen zudem fast 10% der Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt auf, viermal mehr als dies bei den E1-Zellen der Fall war. Ca. 5% der NIH/3T3-Zellen besaßen weniger als den 2N-DNA-Gehalt.

Die Überblendung der Histogramme (Abb. 17A) belegt, daß im Vergleich zu den NIH/3T3-Zellen durch die Überexpression von Wildtyp-Cyclin E1 eine Verkürzung der G1-Phase bei gleichzeitiger Verlängerung der G2/M-Phase verursacht wurde. Eine gegenläufige Verschiebung löste die Überexpression von $\Delta 3/8$ aus, da hier deutlich mehr Zellen in der G1-Phase waren und eine Reduktion der Zellen in G2/M-Phase vorlag (Abb. 17A). Der Anteil der Zellen mit weniger als 2N-DNA-Gehalt war bei den $\Delta 3/8$ -Zellen deutlich höher als bei E1- oder NIH/3T3-Zellen.

G1-Arrest durch Serumentzug

Der 48-stündige Serumentzug führte in allen Zelllinien zu ähnlichen Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 14B, 15B, 16B). Die Zellen breiteten sich mit polygonaler Form flächiger auf dem Untergrund aus, was zugleich mit einer Aufhellung des Zytoplasmas verbunden war. Außerdem erschienen die Zellgrenzen unscharf und verschwommen. Eine deutlich höhere Anzahl abgestorbener Zellen trieb als kugelige, stark lichtbrechende Objekte im Zellkulturmedium. Insgesamt waren höhere Zelldichten als vor Beginn des Serumentzugs festzustellen.

Die FACS-Analyse belegte, daß der Serumentzug zu einem annähernd vollständigen Arrest aller drei Zelllinien in der G1-Phase mit ca. 83% NIH/3T3-Zellen, 68% der E1-Zellen und 72% der $\Delta 3/8$ -Zellen führte. Zugleich war eine deutliche Zunahme von Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt zu verzeichnen, die also weniger als den 2N Chromosomensatz lebender Zellen besaßen. Diese beschädigten und abgestorbenen Zellen machten bei der Linie NIH/3T3 fast 10%, bei E1- und $\Delta 3/8$ -Zellen sogar ca. 20% bzw. ca. 18% der Gesamtzellzahl aus (Abb. 17B).

Zellen 12 Stunden nach Beginn der Serumstimulation

12 Stunden nach Beginn der Serumstimulation hatten die NIH/3T3-Zellen ihr ursprüngliches Aussehen nahezu wiedererlangt. Die Zellen wirkten jedoch schlanker als zuvor und der Anteil von Zelldebris war deutlich erhöht. Es war eine leichte Reduktion der Zelldichte festzuhalten. Die E1- und $\Delta 3/8$ -Zellen hatte ebenfalls wieder die ursprüngliche Form angenommen, wobei allerdings das Zytoplasma heller war als vor dem Serumentzug. Während bei den E1-Zellen eine Zunahme der Zelldichte im Vergleich zum G1-Arrest festzustellen war, hatte sich die Zahl der $\Delta 3/8$ -Zellen nicht wesentlich erhöht (Abb. 14C, 15C, 16C).

Durch die Versorgung mit serumhaltigem Medium erhöhte sich nach 12 Stunden der Anteil an NIH/3T3-Zellen, die sich in die S-Phase oder G2/M-Phase des Zellzyklus befanden, auf ca. 10% bzw. 49%. Bei den E1-Zellen waren fast 58% in die G2/M-Phase übergegangen, die nur von 31 % der $\Delta 3/8$ -Zellen erreicht worden war. Die Anteile an $\Delta 3/8$ -Zellen, die sich in der G1- oder S-Phase befanden, waren deutlich höher als bei E1- und NIH/3T3-Zellen. Die Überblendung der Histogramme (Abb. 17C) der drei Zelllinien für den 12 Stunden Zeitpunkt macht deutlich, daß die E1-Zellen schneller aus dem G1-Arrest durch die S-Phase in die G2/M-Phase übergegangen waren. Die $\Delta 3/8$ -Zellen traten dagegen verlangsamt in die S-Phase ein und entsprechend weniger Zellen hatten 12 Stunden nach Serumstimulation die G2/M-Phase erreicht (Abb. 17C). Auffällig war der insgesamt relativ hohe Anteil an Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt von ca. 15-19% in den drei untersuchten Zelllinien.

Zellen 24 Stunden nach Beginn der Serumstimulation:

Die NIH/3T3- Zellen hatten exakt das Erscheinungsbild wie zu Beginn des Experiments angenommen. Die Zelldichte hatte wenig gegenüber dem Zeitpunkt 12 Stunden zugenommen. Dagegen war die Zelldichte der E1-Zellen erheblich gestiegen. Die E1-Linie bildete eine konfluente Zellschicht aus dichtgedrängten, kleinen Zellen mit kubischer Form und dunkel-granuliertem Zytoplasma. Die Morphologie und Größe der $\Delta 3/8$ -Zellen hatte sich 24 Stunden nach Beginn der Serumstimulation wieder normalisiert. Die Zelldichte war zwar gegenüber dem 12 Stunden Zeitpunkt deutlich gestiegen, war aber erheblich geringer als bei den E1-Zellen. Die Schalen der $\Delta 3/8$ -Zellen waren höchstens zu 80% bedeckt (Abb. 14D, 15D, 16D).

Die FACS-Analysen bestätigten weitgehend die mikroskopischen Beobachtungen. Alle Zelllinien wiesen eine prozentuale Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus auf, die annähernd dem Zustand zu Beginn des Versuchs entsprach. Der Anteil der Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt war in allen Linien stark erhöht (Abb. 17D).

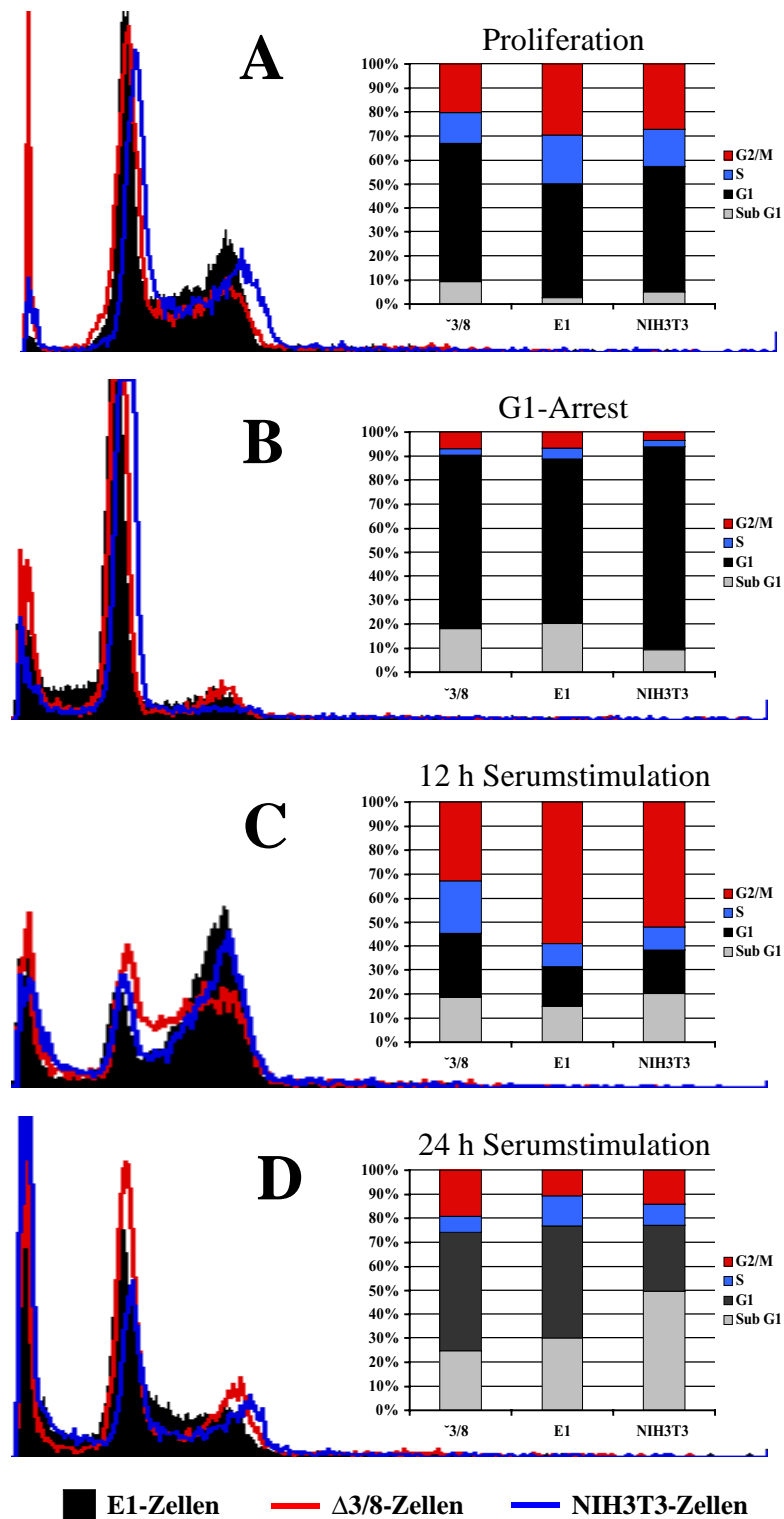


Abbildung 17: FACS-Analyse der Zellzyklus-Progression nach Serumstimulation der stabil transfizierten Zelllinien E1 und Δ3/8 sowie an untransfizierten NIH3T3-Zellen

5. 2 Etablierung eines Tiermodells zum konditionalen Knockout des Cyclin E1-Gens in der Maus

Um die Rolle des Cyclin E1-Gens für die Zellzykluskontrolle insbesondere von Hepatozyten untersuchen zu können, war es Ziel dieser Arbeit, daß Cyclin E1-Gen im Modelorganismus Maus zu inaktivieren. Die zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung stehenden Erkenntnisse ließen den Schluß zu, daß Cyclin E1 essentiell für die Zellzykluskontrolle ist. Es wurde daher von der Lethalität eines homozygoten konstitutiven Knockouts des Cyclin E1-Gens ausgegangen. Dementsprechend sollte die Inaktivierung des murinen Cyclin E1-Gens der Maus durch einen konditionalen Knockout-Ansatz unter Verwendung des cre/loxP-Systems induziert werden.

5. 2. 1 Erste Konzeption eines konditionalen Cyclin E1-Knockouts

5. 2. 1. 1 Herstellung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors

Durch homologe Rekombination des Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors mit dem Cyclin E1-Gen in embryonalen Stammzellen wird ein rekombinantes Allel erzeugt, daß durch Deletion essentieller Sequenzbereiche funktionell deaktiviert werden kann.

Bei der Herstellung eines Gen-Targeting-Vektors war zu berücksichtigen, daß beidseitig des Cyclin E1-Genabschnitts, der zur späteren Deletion mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert werden sollte, ausreichend genomische Sequenzinformation vorhanden sein mußte, um Homologiearme einer Länge von mindestens 500 bp auf der einen und 3000 bp auf der anderen Seite erzeugen zu können. Die Homologiearme und der loxP-flankierte Genabschnitt mußten zudem eine lückenlose Kopie des Cyclin E1 ohne Verluste an Sequenzinformation bilden. Andererseits liegen aber im Gen-Targeting-Vektor zwischen den Genabschnitten zusätzliche Sequenzinformationen in Form eingefügter Restriktionsschnittstellen, der loxP-Erkennungssequenzen sowie der Neomycin-kassette, die im Vorgang der homologen Rekombination z.T. mit in das rekombinante Allel integriert werden. Die Homologiearme und der loxP-flankierte Genabschnitt waren daher so zu konzipieren, daß sich die zusätzlichen Sequenzen in Introns im rekombinanten Allel einfügten, um keine Veränderungen der kodierenden Sequenz zu verursachen. Darüber hinaus war sicher zu stellen, daß durch diese Modifikationen die Consensus-Sequenzen der 5'- und der 3'-Spleißstelle oder die Verzweigungsstelle in den Introns intakt blieben, um Spleißdefekte zu vermeiden.

Für die Herstellung des Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors stand zu Beginn der Arbeiten nur die Sequenzinformation für die Promotorregion und die Exons 1-6 des Cyclin E1-Gens zur Verfügung. Analysen von DNA- und Aminosäuresequenz ergaben, daß nur die Deletion der 135 Basenpaare des Exons 6 zu einer erfolgversprechenden Inaktivierung von Cyclin E1 führen sollte. Exon 6 kodiert für 45 Aminosäuren inklusive der ersten 11 Aminosäuren der Cyclin-Box, das hoch konservierte MRAIL-Motiv bilden. Die Cyclin-Box des Cyclin E1-Proteins ist für die Bindung und Aktivierung des natürlichen Bindungspartners, der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (cdk2), von essentieller Bedeutung.

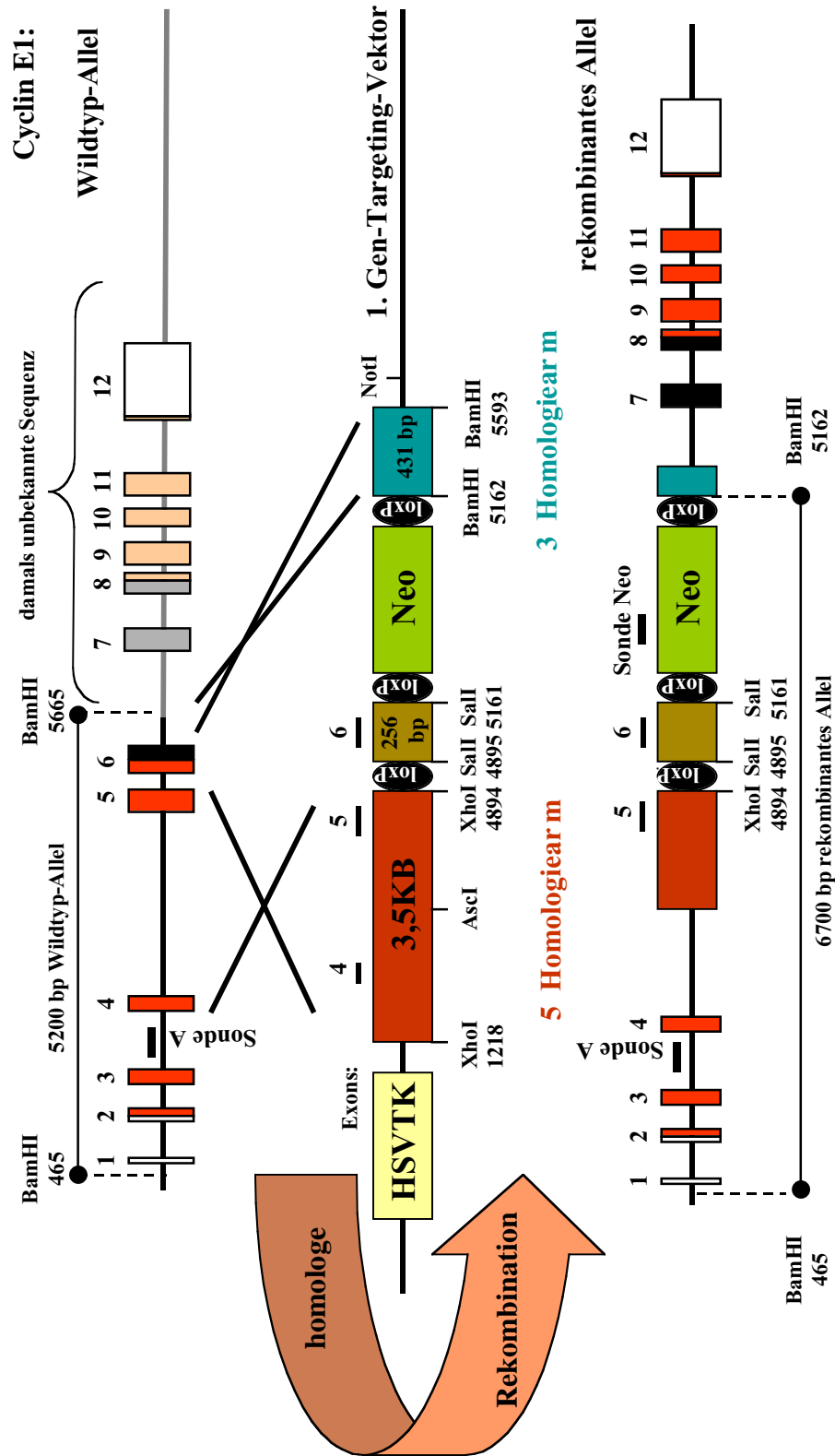


Abbildung 18: 1. Konzeption zur homologen Rekombination des Cyclin E1-Gens in murinen ES-Zellen. Das Plasmid pEasyFlox diente als Basisvektor für die Herstellung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting Vektors. Hierzu wurde der 5' Homologiearm aus zwei Teilen über *XhoI*- und *AscI*-Schnittstellen und der zu deletierende Genbereich (Exon 6) über *SalI*-Schnittstellen zwischen loxP-Erkennungssequenzen in pEasyFlox eingefügt. Der 3' Homologiearm wurde über *BamHI*-Schnittstellen stromaufwärts der loxP-flankierten Neomycin-Kassette inseriert. Nach Elektroporation des *NotI*-linearisierten Gen-Targeting-Vektors in ES-Zellen sollte durch homologe Rekombinationen im Bereich der Homologiearme die loxP-flankierte Neomycin-Kassette und das loxP-flankierte Exon 6 in das Cyclin E1-Gen integriert werden. Das entstehende rekombinante Allel unterscheidet sich im Southern Blot nach *BamHI*-Restriktionsspaltung der DNA und Hybridisierung mit der Sonde A mit einer Größe von ca. 6700 bp eindeutig vom Wildtyp-Allel mit ca. 5200 bp.

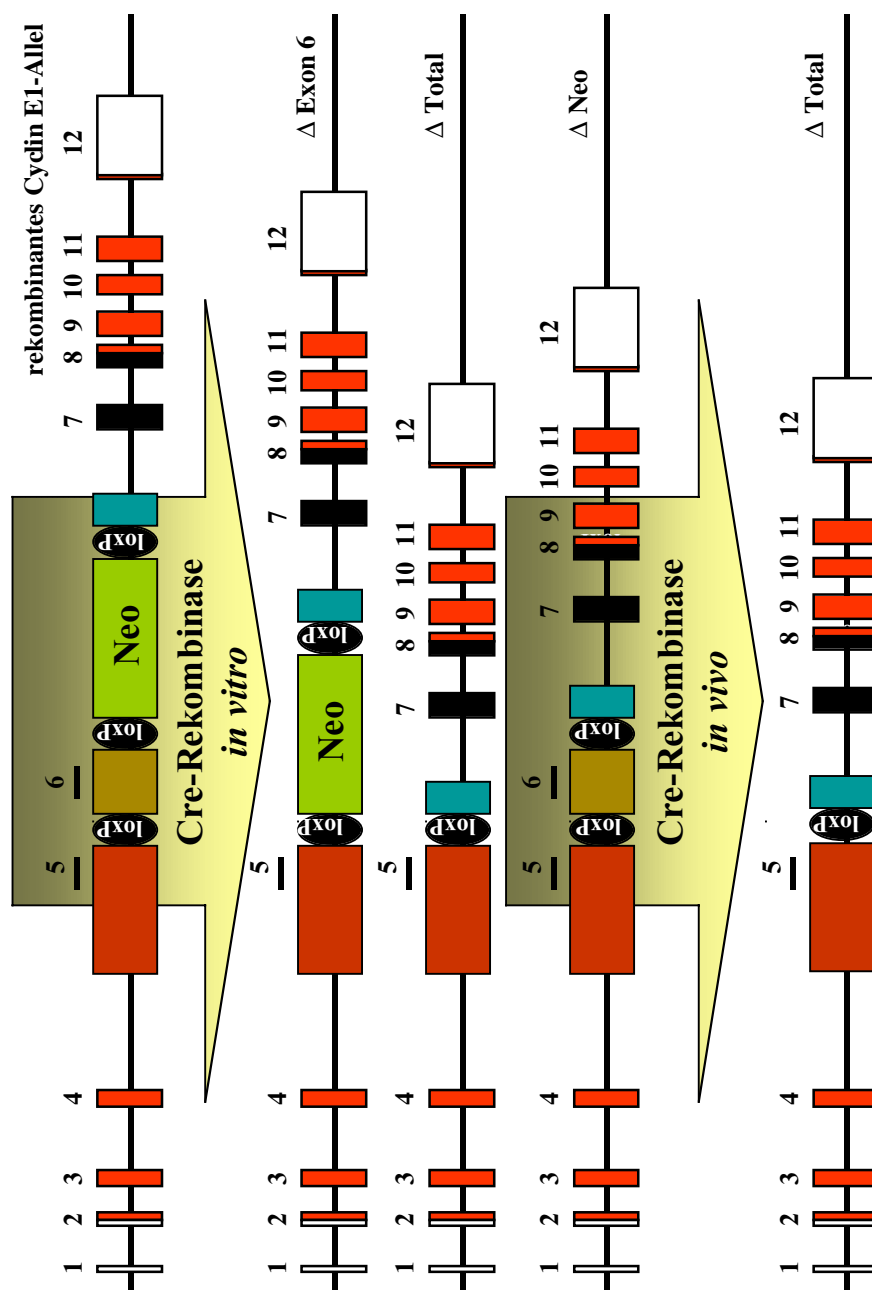


Abbildung 19: Deletion der Neomycin-Kassette und des Exon 6 durch Expression der Cre-Rekombinase *in vitro* und *in vivo*. Nach Elektroporation des Plasmids PGKCre in ES-Zellen, die das rekombinante Cyclin E1-Allel tragen, deletiert die exprimierte Cre Rekombinase wahlweise nur das loxP-flankierte Exon 6 (Δ Exon 6), Exon 6 und die Neomycin-Kassette (Δ Total) oder ausschließlich die loxP-flankierte Neomycin-Kassette (Δ Neo). ES-Zellklone mit dem Δ Neo-Allel sollten zur Herstellung chimärer Mäuse mittels Blastozysteninjektion benutzt werden, um einen Mausstamm mit modifiziertem Cyclin E1- Δ Neo-Allel zu etablieren. Nach Verpaarung dieser Cyclin E1- Δ Neo-Tiere mit Cre-transgenen Mäusen sollten Nachkommen entstehen, in denen die Cre-Rekombinase zellspezifisch das Cyclin E1-Gen durch Deletion des Exon 6 (Δ Total) inaktiviert.

Daher sollten keine aktiven Komplexe mit einem Cyclin E1-Protein gebildet werden, das durch die Exon 6-Deletion eine unvollständige Cyclin-Box enthält.

Alle für die Herstellung des Gen-Targeting-Vektors benötigten Abschnitte des genomischen Cyclin E1-Gens wurden durch PCR-Amplifikation mit Primern erzeugt, an die die zur Klonierung notwendigen Restriktionschnittstellen bei der Synthese angehängt worden waren. Die amplifizierten Cyclin E1-Abschnitte wurden zunächst in den Vektor pCR2.1 T/A-kloniert und die Integrität der kodierenden Bereiche durch Sequenzierung bestätigt. Als Template für die PCR-Reaktionen diente genomische C57BL/6-DNA, die isogen zu den aus C57BL/6 stammenden ES-Zellen war, die manipuliert werden sollten.

Für die Klonierung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors diente der Vektor pEasyFlox als Grundlage (Abb. 18). pEasyFlox enthält drei loxP-Erkennungssequenzen, die zugleich eine Neomycin-Kassette und eine Polylinkerregion umschließen. In diese wurde das zu deletierende Exon 6 des murinen Cyclin E1-Gens mit flankierenden Intronsequenzen, insgesamt 256 Basenpaare, über eine *SalI*-Schnittstellen inseriert. Da beidseitig des Exon 6 keine adäquaten *SalI*-Schnittstellen zur Verfügung standen, wurde der Exon 6-Bereich über die Primer D plus/D minus, an die *SalI*-Schnittstellen angehängt wurden, mittels PCR amplifiziert. Flankierend zu den äußeren loxP-Erkennungssequenzen wurden die sogenannten Homologiearme, über die die Rekombinationsprozesse stattfinden sollten, in den Vektor eingebaut. Der 5' Homologiearm wurde in zwei Teilen mittels PCR mit Primer mit angehängten *XhoI*- bzw. *AscI*-Schnittstellen (Primer B plus/B minus sowie Primer C plus/C minus) erzeugt. Beide Teile wurden dann simultan in die *XhoI/AscI*-Schnittstelle im pEasyFlox-Vektor eingefügt. Insgesamt besaß der 5' Homologiearm eine Länge von ca. 3,5 KB. Der 3' Homologiearm war aufgrund der begrenzten Sequenzinformation nur 435 Basenpaare lang. Über Primer mit angehängten *BamHI*-Schnittstellen (Primer E plus/E minus) wurde dieser Abschnitt ebenfalls durch PCR amplifiziert und 3' der loxP-Erkennungssequenz in eine entsprechende *BamHI*-Schnittstelle ligiert (Abb. 18). Durch Sequenzierung des vollständigen 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors wurde bestätigt, daß alle loxP-Erkennungssequenzen und kodierenden Genabschnitte fehlerlos waren und korrekt positioniert vorlagen.

Die Konzeption für den 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor (Abb.18) berücksichtigte die Notwendigkeit, nach homologer Rekombination ES-Zellen mit rekombinanten Allel von solchen ohne oder mit zufälliger Integration des Gen-Targeting-Vektors durch Southern Blot-Analyse differenzieren zu können. Zu diesem Zweck wurde durch PCR mit den Primern A plus/ A. die Sonde A mit 329 bp Länge erzeugt, die im Intron zwischen den Exons 3 und 4 des Cyclin E1-Gens extern des 5' Homologiearms hybridisierte. Anhand eines *BamHI*-Restriktionsverdaus an Wildtyp-DNA von C57BL/6 und anschließendem Southern Blot sowie radioaktiver Hybridisierung wurde ein Fragment mit einer Länge ca. 5,2 KB detektiert, das das Cyclin E1-Wildtyp-Allel repräsentierte. Dieses Vorgehen war notwendig, da die zu diesem Zeitpunkt bekannte genomische Cyclin E1-Sequenz auf der 5' Seite der Sonde A keine *BamHI*-Schnittstelle mehr enthielt. In Vergleich dazu war die Länge des Fragments des rekombinanten Cyclin E1-Allel mit ca. 6,7 KB Größe berechnet worden (Abb. 18).

5. 2. 1. 2 **Elektroporation, Selektion und Identifizierung des rekombinanten Cyclin E1-Allels in Bruce4-Zellen**

Der *NotI*-linearisierte 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor wurde durch Elektroporation in ES-Zellen der Linie Bruce4, die aus C57BL/6-Embryonen stammten, transfiziert. Die ES-Zellen wurden anschließend durch G418 (230µg/ml) und Ganciclovir selektioniert, um Zellen mit rekombinanten Cyclin E1-Allel anzureichern. Die Zahl der überlebenden ES-Zellklone ohne oder mit zufälliger Integration des Gen-Targeting-Vektors wurden durch dieses Verfahren um den Faktor 10 reduziert. Dreihundert ES-Zellklone wurden dann auf homologe Rekombination durch *Bam*HI-Verdau, Southern Blot und radioaktiver Hybridisierung mit der Sonde A getestet. Bei 8 Klonen, was 2,6% der insgesamt untersuchten Klone entsprach, war ein zusätzliches Fragment nachweisbar (Abb. 20A).

Das Wildtyp-Fragment entsprach der erwarteten Größe von ca. 5,2 KB. Das zusätzliche Fragment erschien jedoch größer als die für das rekombinante Allel prognostizierten 6,7 KB. Zur Kontrolle wurde daher eine zweite radioaktive Hybridisierung mit einer für Neomycin-spezifischen Sonde durchgeführt (Abb. 18; Abb 20A). Auch mit dieser zweiten Sonde wurde bei den 8 rekombinanten Klonen nach *Bam*HI-Verdau ein identisches Fragment detektiert (vergleiche Abb. 18 und Abb. 20A unten), wodurch die homologe Rekombination des Gen-Targeting-Vektors in den Cyclin E1-Lokus zusätzlich bestätigt wurde.

5. 2. 1. 3 **Deletionen durch Expression der Cre-Rekombinase *in vitro***

Die rekombinanten ES-Zellklone III. A2 und III. H6 wurden ausgewählt, um durch transiente Expression der Cre-Rekombinase ES-Zellen zu generieren, um selektiv die Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Cyclin E1-Allel zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid PGKCre, das die Cre-Rekombinase in eukaryontischen Zellen exprimiert, in die ES-Zellen elektroporiert. Jeweils 96 der resultierenden Klone wurden pro Zelllinie daraufhin untersucht, welches der drei möglichen Deletionsereignisse in den Klonen stattgefunden hatte (Abb. 19). Dazu wurden die ES-Zell-DNAs durch *Bam*HI-Spaltung, Southern Blot und radioaktive Hybridisierung mit der Sonde A untersucht. Es wurde erwartet, dass die Deletion der Neomycin-Kassette ein Fragment von ca. 4,7 KB (Δ Neo) ergeben sollte. Die Eliminierung des Exon 6-Bereichs (Δ Exon 6) bzw. beider Elemente (Δ Total) sollte Fragmente der Größen 6,4 KB bzw. 4,4 KB erzeugen (Abb. 19). In keinem der von III. A2 oder III. H6 abstammenden Klone konnte die gesuchte Δ Neo-Deletion eindeutig nachgewiesen werden. Es traten überwiegend Klone auf, in denen die Cre-Rekombinase unvollständige Δ Total-Deletionen verursacht hatte (Abb. 20B).

Um zu klären, welche Cre-vermittelten Deletionen überhaupt nachweisbar waren, wurden die nicht zur Einzelanalyse vorgesehenen, Cre behandelten Subklone des rekombinanten Klones III.A2 "gepoolt", die DNA extrahiert und eine PCR-Analyse auf Cre-vermittelte Rekombinationsereignisse durchgeführt. Diese Untersuchung zeigte, daß in den ES-Zellen des Klon III.A2 nach Cre-Expression zumindest die Δ Neo- und die Δ Total-Deletionen nachweisbar waren (Abb. 20B).

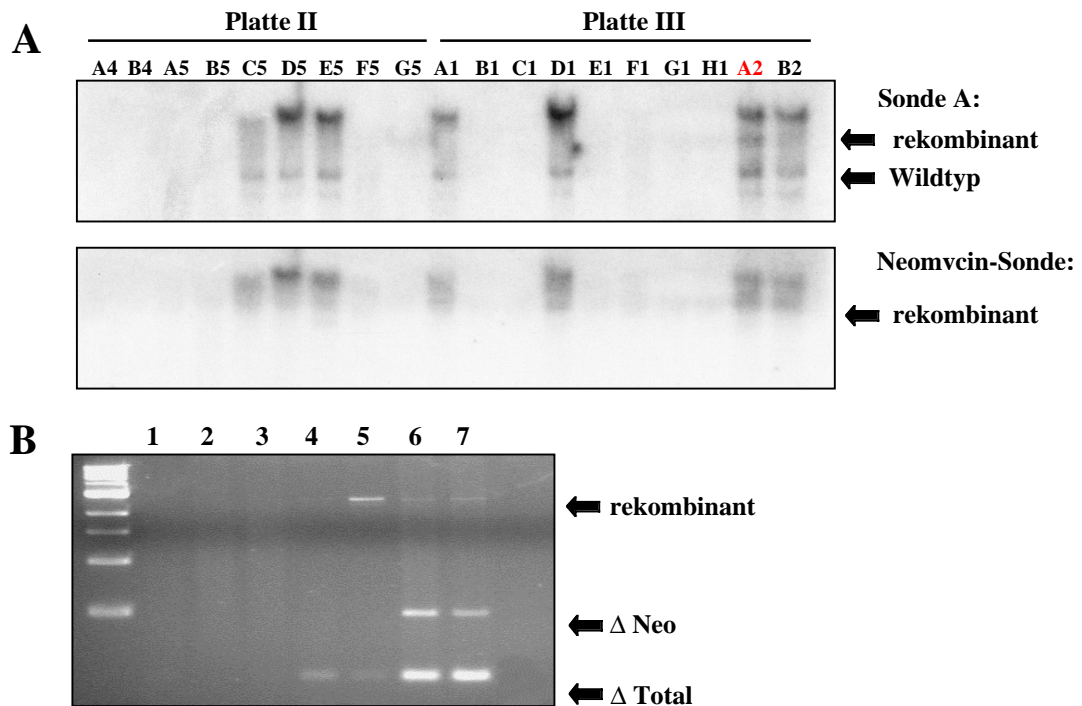


Abbildung 20: Analysen zur Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone nach Elektroporation mit dem 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor in Bruce4-Zellen.

A Beispiel einer Southern-Blot-Analyse nach *Bam*HI-Spaltung mit der Sonde A und der Neomycin-spezifischen Sonde. Die Zellen des Klon III.A2 enthalten ein rekombinantes Cyclin E1-Allel, da beide Sonden ein identisches DNA-Fragment ähnlichen Größe detektieren. **B** PCR-Analyse mit den Primern HSVTKIII/ARM zur Identifizierung deletierter ES-Zellen nach Expression der Cre-Rekombinase *in vitro*; die als Kontrollen eingesetzten genomischen DNAs von 129Ola (Spur 1), C57Bl/6 (Spur 2) und Bruce4-Zellen (Spur 3) ergaben erwartungsgemäß kein PCR-Produkt. Nach Expression der Rekombinase in Zellen des Klons III.A2 wurden die Subklone III.A2-Cre/A4 (Spur 4) und III.A2-Cre/B2 (Spur 5) isoliert, die neben dem rekombinanten auch das ΔTotal-Allel aufwiesen. Nach Cre-Expression wurden die nicht zur Einzelanalyse genutzten Subklone von III.A2 "gepoolt"; in dieser DNA (Spuren 6 und 7) trat auch das gewünschte ΔNeo-Allel auf; -: Negativkontrolle.

Die oben genannten Experimente zur homologen Rekombination mit dem 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor wurden zusätzlich in ES-Zellen der Linie R1 aus 129SV-Mäusen wiederholt, ohne jedoch den gewünschten Erfolg zu erzielen.

Somit erbrachten die bisherigen Versuche keine rekombinante ES-Zelllinie ohne Neomycin-Kassette. Um das Probleme der Deletion der Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Allel zu umgehen, wurde ein Strategiewechsel vorgenommen.

5. 2. 2 Modifikation von pEasyFloX durch Insertion von FRT-Erkennungssequenzen

Die die Neomycin-Kassette flankierenden loxP-Erkennungssequenzen im Basisvektor pEasyFloX sollten durch FRT-Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (LEE, TRIBBLE and JAYARAM, 2000; TRIBBLE et al, 2000) ersetzt werden. Der zu deletierende Genabschnitt sollte weiterhin zwischen loxP-Erken-

nungssequenzen inseriert werden. In einem rekombinanten Allel, daß durch homologe Rekombination mit einem solchen 2loxP-2FRT-Vektor entsteht, wird spezifisch durch die Tätigkeit der FLP-Rekombinase nur die Neomycin-Kassette entfernt. Das Prinzip ist in Abb. 27 dargestellt.

5. 2. 2. 1 Herstellung des 2 loxP-2 FRT-Basisvektors: pNeoFlirt

Die Neomycin-Kassette aus pEasyFlox wurde in zwei Teilabschnitten mit FRT-Erkennungssequenzen amplifiziert (Abb. 21). Die PCR 5'-Neo mit den Primern NcoIfor /pBackbone1 (Abb 21A) modifizierte den 5'-Anteil der Neomycin-Kassette, in dem sich der Primer pBackbone1 zwar an den PGK-Promotor des Neomycinphosphotransferase-Gens anlagert, dabei aber eine FRT-Erkennungssequenz und eine *Bam*HI-Schnittstelle statt der loxP-Erkennungssequenz aufwies.

Die in Abb. 21B dargestellte PCR 3'-Neo1 erzeugte einen veränderten 3'-Anteil der Neomycin-Kassette mit den Primern pBackbone2/NcoIrev. pBackbone2 fügte an das 3'-Ende des Neomycinphosphotransferase-Gens eine FRT-Erkennungssequenz und eine *Fse*I-Schnittstelle an.

Das Produkt aus der PCR 3'-Neo1 wurde als Template für die PCR 3'-Neo2 eingesetzt (Abb. 21C). Letztere basierte auf den Primern pBackbone3/NcoIrev. pBackbone3 war komplementär zur 3'-FRT-Erkennungssequenz, wobei aber eine loxP-Erkennungssequenz mit anschließender *Sal*I-Schnittstelle angehängt worden war, so daß das Produkt PCR 3'-Neo2 entstand. Alle PCR-Produkte waren in den Vektor pCR2.1 zwischenkloniert und anschließend sequenziert worden.

Aus dem Vektor pEasyFlox wurde die Neomycinkassette mit den flankierenden loxP-Erkennungssequenzen mit den Restriktionsendonukleasen *Sal*I und *Bam*HI eliminiert. Daraufhin erfolgte die simultane Insertion der PCR-Produkte PCR 5'-Neo und PCR 3'-Neo2, die mit *Sal*I/*Nco*I bzw. *Nco*I/*Bam*HI aus dem Zwischenvektor ausgeschnitten worden waren (Abb. 21D). Ergebnis war ein Vektor mit einer FRT-flankierten Neomycin-Kassette und einer loxP-flankierten *Sal*I-Schnittstelle. Die Überprüfung der von Modifikationen betroffenen Teile des Vektors fand durch Sequenzierung statt. Der neu entstandene Basisvektor erhielt den Namen pNeoFlirt.

5. 2. 2. 2 Funktionelle Evaluierung von pNeoFlirt

Zur funktionellen Analyse des Vektors pNeoFlirt, wurde dieser mit *Kpn*I, daß im HSVTK-Gen schneidet (Abb. 22A), linearisiert und mittels Calciumphosphat-Methode in Huh7-Zellen transfiziert. Nach 10tägiger Selektion mit G418 (230µg/ml) hatten sich stabil transfizierte, G418-resistente Zellen etabliert. Diese Zellen wurden mit einem Expressionsvektor, der für die gentechnisch optimierte FLPe-Rekombinase (BUCHHOLZ, ANGRAND and STEWART, 1998) kodiert, transient transfiziert, um die zwischen den FRT-Erkennungssequenzen gelegene Neomycin-Kassette aus pNeoFlirt zu deletieren. Vor bzw. 16, 40 und 64 Stunden nach Beginn der FLPe-Transfektion wurden Zellen zur Extraktion genomischer DNA geerntet. Die vergleichende PCR-Analyse mit den Primern NeoFlirtI/NeoFlirtII (Abb. 22A) ergab, daß in den stabil transfizierten Zellen

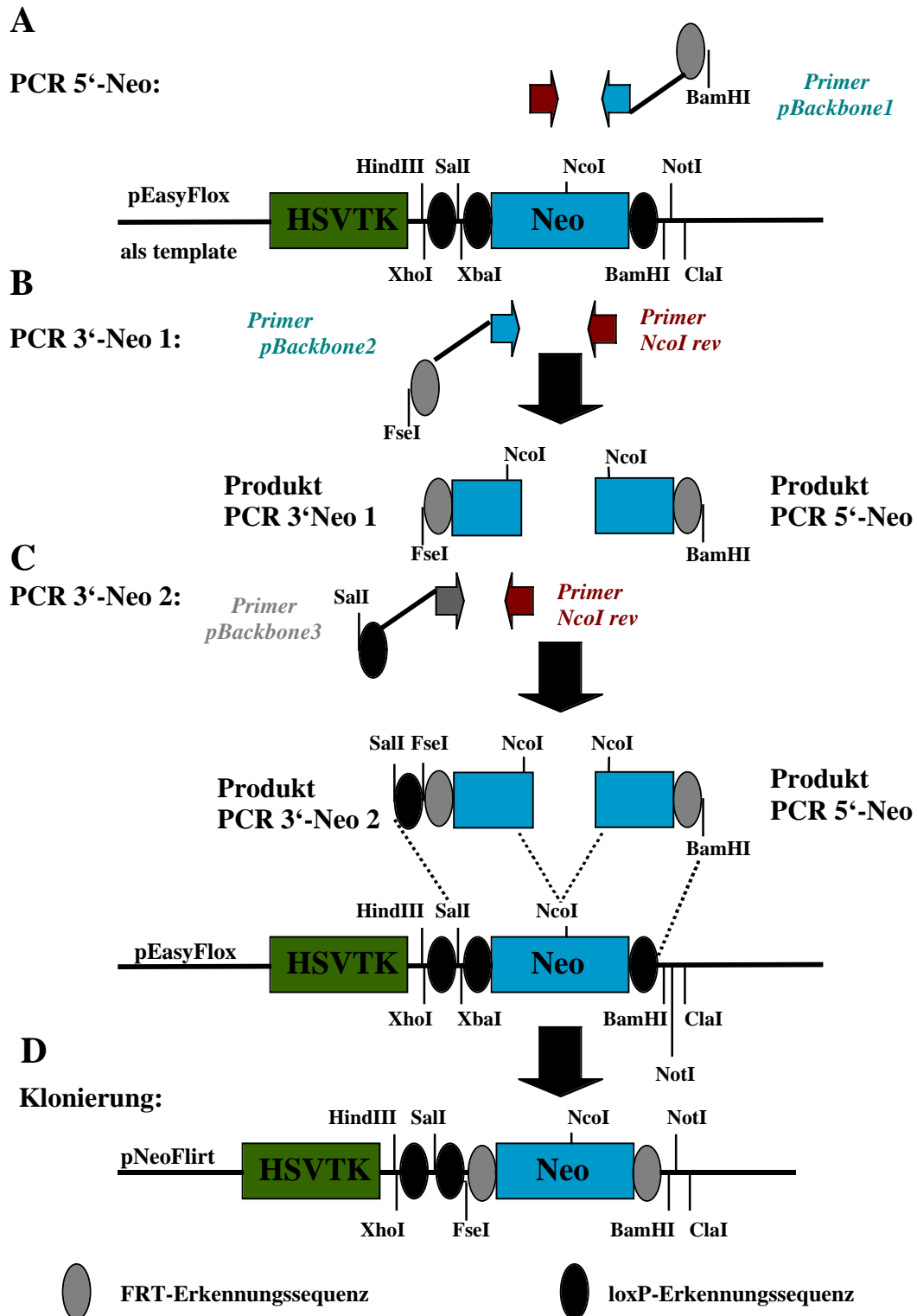


Abbildung 21: Herstellung des Vektors pNeoFlirt. C und D: Durch separate PCR-Amplifikation des 3'-Bereichs sowie A: des 5'-Bereichs der Neomycin-Kassette von pEasyFloX mit modifizierten Primern wurden FRT-Erkennungs-sequenzen angefügt; D: durch Substitution der loxP-flankierten Neomycin-Kassette in pEasyFloX durch die Fragmente PCR 3'-Neo 2 und PCR 5'-Neo wurde der Vektor pNeoFlirt mit FRT-flankierter Neomycin-Kassette erzeugt.

Huh7-Flirt die integrierte Neomycin-Kassette nachweisbar war (Abb. 22B). Bereits 16 Stunden nach Transfektionsbeginn war die 2,5 KB-Bande der Neomycin-Kassette vollständig durch die Neomycin-Deletionsbande mit ca. 0,5 KB ersetzt worden (Abb. 22). Dieses Experiment belegt die Funktionsfähigkeit von pNeoFlirt *in vitro*.

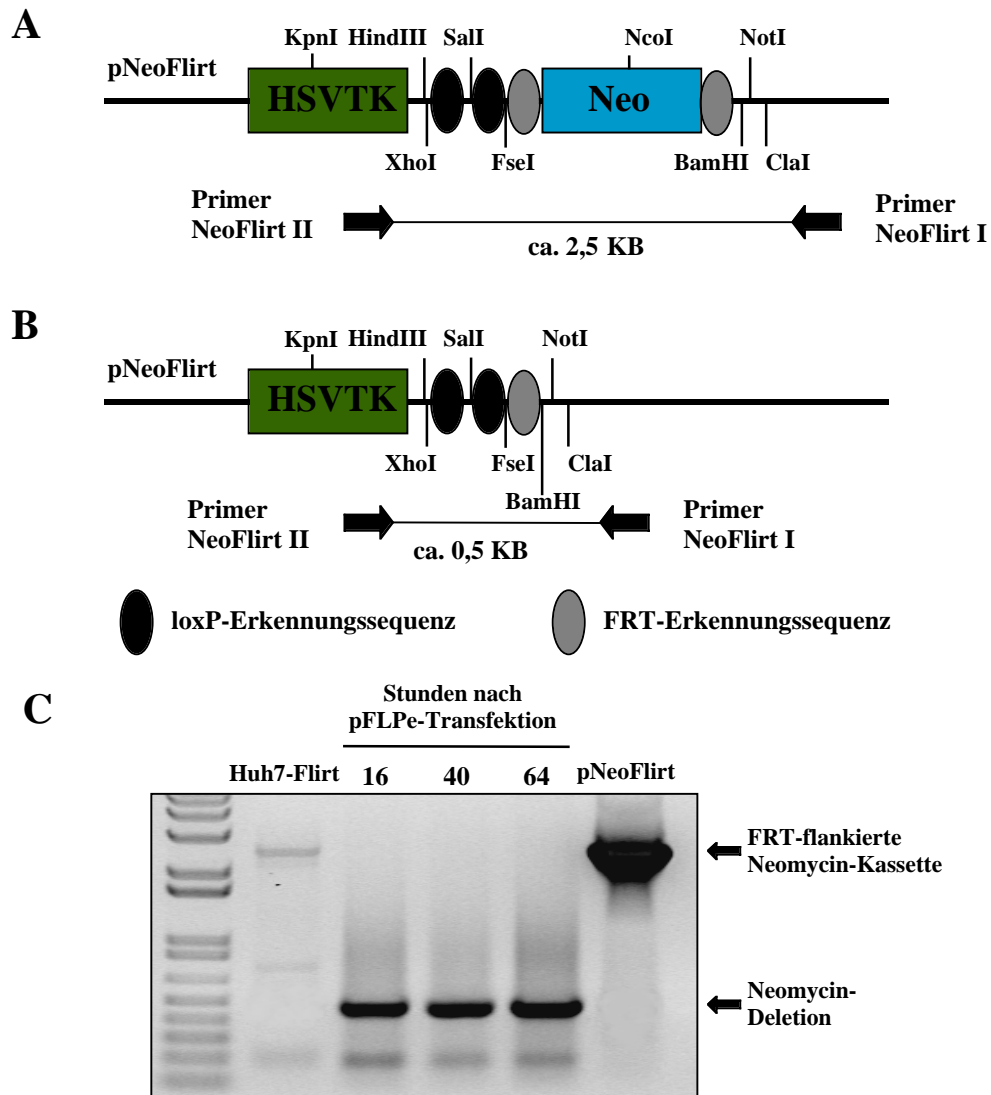


Abbildung 22: *In vitro*-Deletion der Neomycin-Kassette von pNeoFlirt durch die Rekombinase FLPe. Durch PCR-Amplifikation von pNeoFlirt mit den Primern NeoFlirt I und II wurden Produkte mit Größen von **A** ca. 2,5 KB vor Deletion und **B** ca. 0,5 KB nach Deletion der Neomycin-Kassette erwartet. **C** In Huh7-Zellen, die stabil mit pNeoFlirt transfiziert wurden (Huh7-Flirt), konnte die Deletion der Neomycin-Kassette bereits 16 Stunden nach transienter Transfektion mit pFLPe nachgewiesen werden.

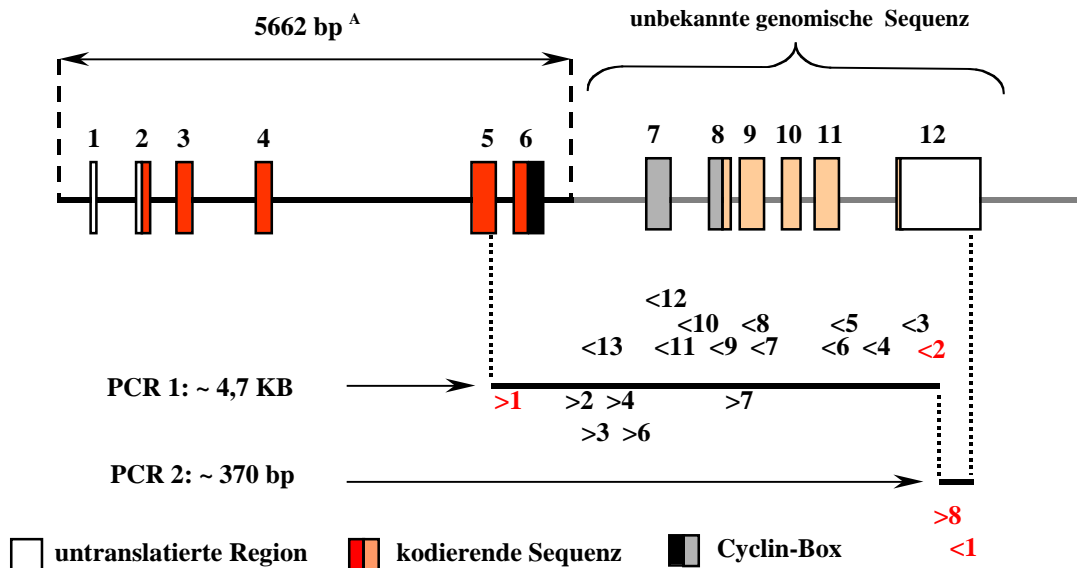


Abbildung 23: PCR-Amplifikation und Sequenzierung des 3'-Bereichs des murinen Cyclin E1-Gens; PCR1 mit den Primern Genom1for (>1) und GENOM2rev (<2) ergab ein Produkt von ca. 4,7 KB; PCR2 mit den Primern Genom1for (>8) und GENOM2rev (<1) ergab ein Produkt von ca 370 bp; die Primer Genom2for bis Genom7for (>2 bis >7) und GENOM3rev bis GENOM13rev (<3 bis <13) wurden zur Sequenzierung mittels Cycle Sequencing eingesetzt; ^A:Die entsprechende Sequenzinformation wurde freundlicherweise von P. Jansen-Dürr zur Verfügung gestellt.

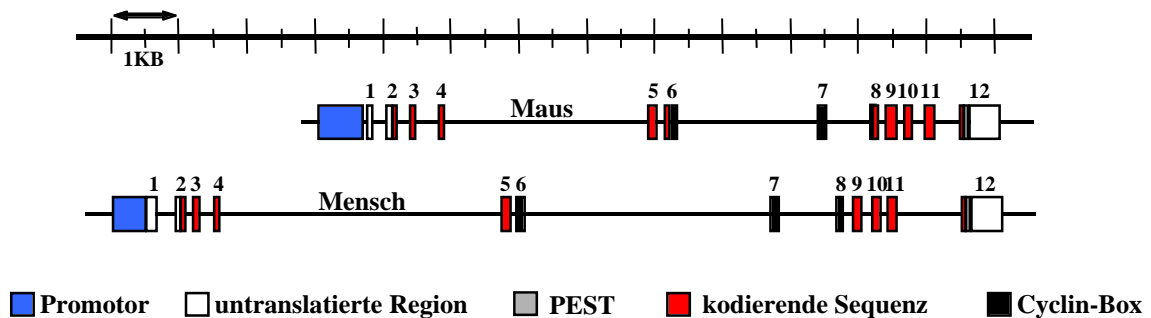


Abbildung 24: Vergleich der Strukturen der Cyclin E1-Gene von Maus und Mensch

5. 2. 3 Klonierung und Sequenzierung des murinen Cyclin E1 3' Bereichs

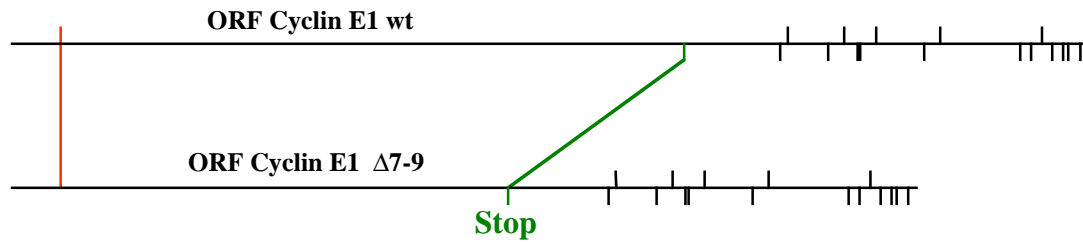
Zur Optimierung des Cyclin E1-Gene Targeting Vektors war es notwendig, die vollständige genomische Sequenz des Cyclin E1-Gens zu kennen. Dazu wurde der bis dahin nicht bekannte 3'-Teil der genomischen Sequenz des murinen Cyclin E1-Gens aus genomischer C57BL/6-DNA mittels PCR isoliert. Mit den aus der cDNA abgeleiteten Primern Genom1for/GENOM2rev und Genom8for/GENOM1rev wurden DNA-Fragmente von ca. 4,7 KB bzw. ca. 370 bp amplifiziert und in pCR2.1 kloniert (Abb. 23). Die Sequenzierung jeweils zweier rekombinanter Plasmide mit M13-Primern bestätigte übereinstimmend, daß es sich um Teile der genomischen Cyclin E1-Sequenz handelte.

Die Sequenzierung des 3'-Teils des Cyclin E1-Gens der Maus ergab, daß in diesem Bereich 6 weitere Exons lokalisiert sind. Diese bilden einen Kluster, in dem die Exons nur durch relativ kleine Introns separiert werden. Die für die Cyclin-Box kodierende Sequenz ist demnach in den Exons 6, 7 und 8 enthalten. Das Exon 12 mit 664 Basenpaaren beinhaltet das PEST-Signal (KOFF et al, 1991; LEW, DULIC and REED, 1991) und eine große, untranslatierte Region (Abb. 24, Tab. 2). Der Vergleich mit der später vom amerikanischen National Institute of Health veröffentlichten Sequenz ergab eine Übereinstimmung von 97,6 % (Anhang 3).

Insgesamt ergab der Vergleich der Cyclin E1-Gene von Mensch und Maus, daß das menschliche Cyclin E1-Gen mit 12317 bp um ca. 3000 bp größer ist als das Cyclin E1-Gen der Maus. Der Größenunterschied beruhte auf dem höheren Anteil an Intronsequenzen im menschlichen Cyclin E1-Gen (Abb. 24, Tab. 2). Beide Gene enthalten 12 Exons. Übereinstimmend sind die Exons 1-4 und 7-12 als Gruppen angeordnet, während die Exon 5 und 6 von große Introns eingerahmt im Zentrum der genomischen Sequenz liegen. Die Cyclin-Box wird in beiden Fällen von den Exons 6-8 kodiert. Insgesamt wurde ein hoher Grad an Homologie in der Struktur der Cyclin E1-Gene von Maus und Mensch festgestellt, die die Eignung der Maus als Modellorganismus zur Erforschung der Funktionen des Cyclin E1-Gens unterstreicht.

Tabelle 2: Vergleich der Exon- und Introngrößen [in bp] der Cyclin E1-Gene von Mensch und Maus

	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3	Intron 3
<i>M. musculus</i>	97	492	42	104	87	249
<i>H. sapiens</i>	148	380	46	76	87	193
	Exon 4	Intron 4	Exon 5	Intron 5	Exon 6	Intron 6
<i>M. musculus</i>	69	3085	148	125	135	2085
<i>H. sapiens</i>	69	4100	146	124	138	3161
	Exon 7	Intron 7	Exon 8	Intron 8	Exon 9	Intron 9
<i>M. musculus</i>	146	671	95	187	134	110
<i>H. sapiens</i>	148	874	96	179	134	110
	Exon 10	Intron 10	Exon 11	Intron 11	Exon 12	gesamt
<i>M. musculus</i>	111	98	157	355	651	9336
<i>H. sapiens</i>	111	95	157	1052	686	12317

A**B**

Cyclin E1 wt	MPRERDSTDH	SNMKEEGGSD	LSVRSRKRKA	NVAVFLQDPD	40
Cyclin E1 $\Delta 7-9$	MPRERDSTDH	SNMKEEGGSD	LSVRSRKRKA	NVAVFLQDPD	40
EEIAKIDKTV	KSEDSSQPWD	DNSACVDPCS	FIPTPNKEED	NELEYPRTAF	90
EEIAKIDKTV	KSEDSSQPWD	DNSACVDPCS	FIPTPNKEED	NELEYPRTAF	90
QPRKIRPPRA	SPLPVLNWGN	REEVWRIMLN	KEKTYLRDEH	FLQRHPLLQA	140
QPRKIRPPRA	SPLPVLNWGN	REEVWRIMLN	KEKTYLRDEH	FLQRHPLLQA	140
RMRAVLLDWL	MEVCEVYKLH	RETFYLAQDF	FDRYMASQQN	IIKTLLQLIG	190
RMRAVLLDWL	ME-----	-----	-----	-----	152
ISALFIASKL	EEIYPPKLHQ	FAYVTDGACS	GDEILTMELM	MMKALKWRLS	230
-----	-----	-----	-----	-----	152
PLTIVSWLNV	YVQVAYVNDT	GEVLMPQYPO	QVFVQIAELL	DLCVLDVGCL	280
-----	-----	-----	-----LL	DLCVLDVGCL	165
EFPGYGLAAS	ALYHFSSLEL	MQKVSGYQWC	DIEKCVKWMV	PFAMVIREMG	330
EFPGYGLAAS	ALYHFSSLEL	MQKVSGYQWC	DIEKCVKWMV	PFAMVIREMG	215
SSKLKHFRGV	PMEDSHNIQT	HTNSLDLLDK	AQAKKAILSE	QNRISPPPSV	380
SSKLKHFRGV	PMEDSHNIQT	HTNSLDLLDK	AQAKKAILSE	QNRISPPPSV	265
VLTPPPSSKK	QSSEQETE				408
VLTPPPSSKK	QSSEQETE				283

Abbildung 25: Inaktivierung des murinen Cyclin E1-Gens durch Deletion der Cyclin-Box in den Exons 7-9 als Strategie des 2. Konstrukts. A Die Deletion der Exons 7-9 führt zu einer Verkürzung, aber nicht zu einer zusätzlichen Verschiebung des offenen Leserahmens (ORF) des $\Delta 7-9$ -Allels im Vergleich zu Wildtyp-Cyclin E1. B Nach Entfernung der Cyclin-Box (blau) ist die Aminosäuresequenz des $\Delta 7-9$ -Allels N-terminal- und C-terminal der Deletion weiterhin identisch zum Wildtyp-Cyclin E1-Protein.

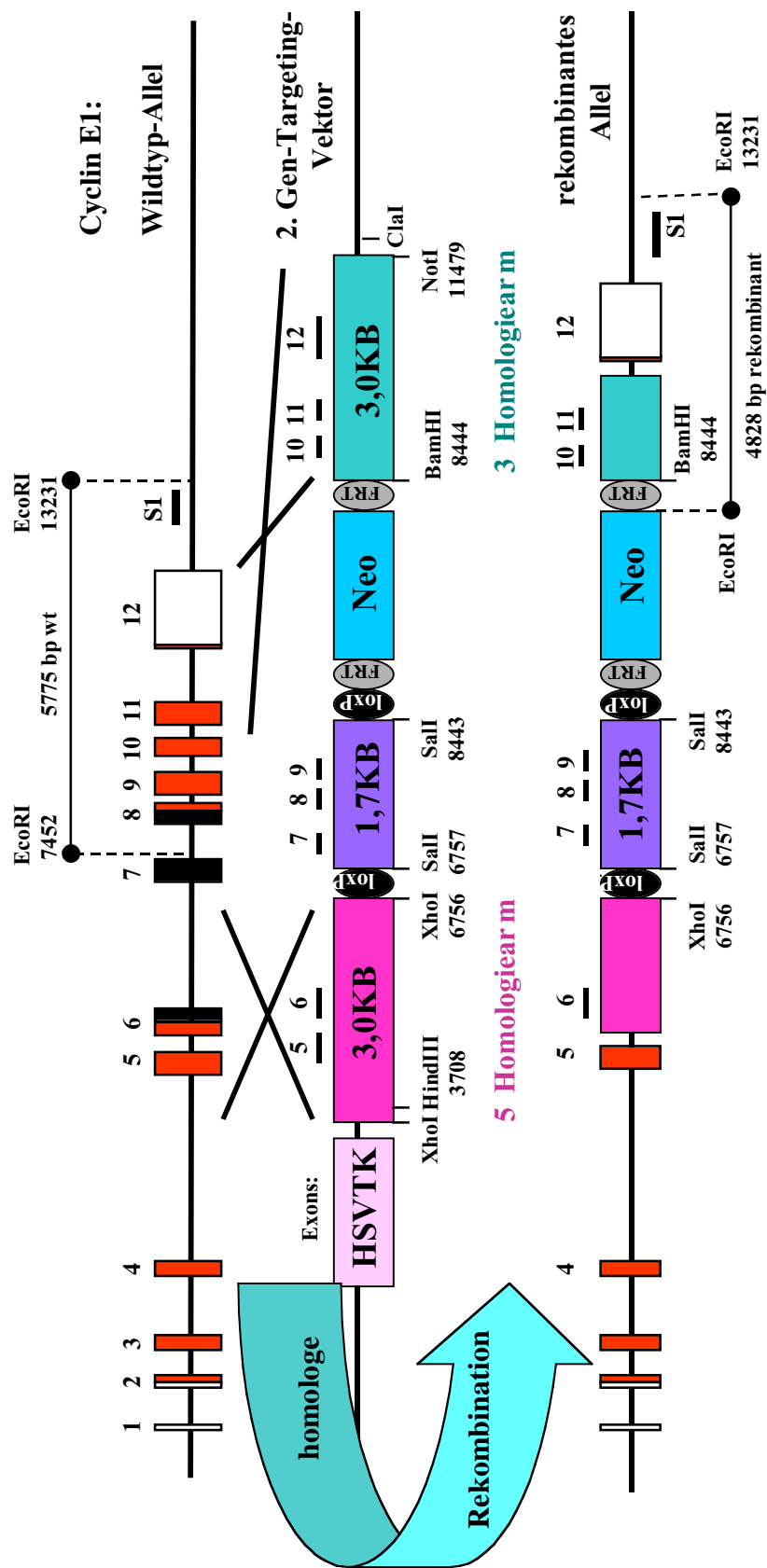


Abbildung 26: 2. Konzeption zur homologen Rekombination des Cyclin E1-Gens in murinen ES-Zellen. Das Plasmid pNeoFlirt diente als Basisvektor für die Herstellung des 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors. Hierzu wurden der 5' Homologearm über *XhoI*-Schnittstellen und der zu deletierende Genbereich (Exon 7-9) über *SalI*-Schnittstellen zwischen loxP-Erkennungssequenzen in pNeoFlirt eingefügt. Der 3' Homologearm wurde über *BamHI*- bzw. *NotI*-Schnittstellen stromaufwärts der FRT-flankierten Neomycin-Kassette inseriert. Nach Elektroporation des *Clal*-linearisierten 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors in ES-Zellen wurden durch homologe Rekombinationen im Bereich der Homologearme die FRT-flankierte Neomycin-Kassette und die loxP-Erkennungssequenzen in das Cyclin E1-Gen integriert. Das entstandene rekombinante Allel kann im Southern Blot nach *EcoRI*-Restriktionsspaltung der DNA und Hybridisierung mit der Sonde S1 mit einer Größe von ca. 4800 bp eindeutig vom Wildtyp-Allel mit ca. 5700 bp unterschieden werden.

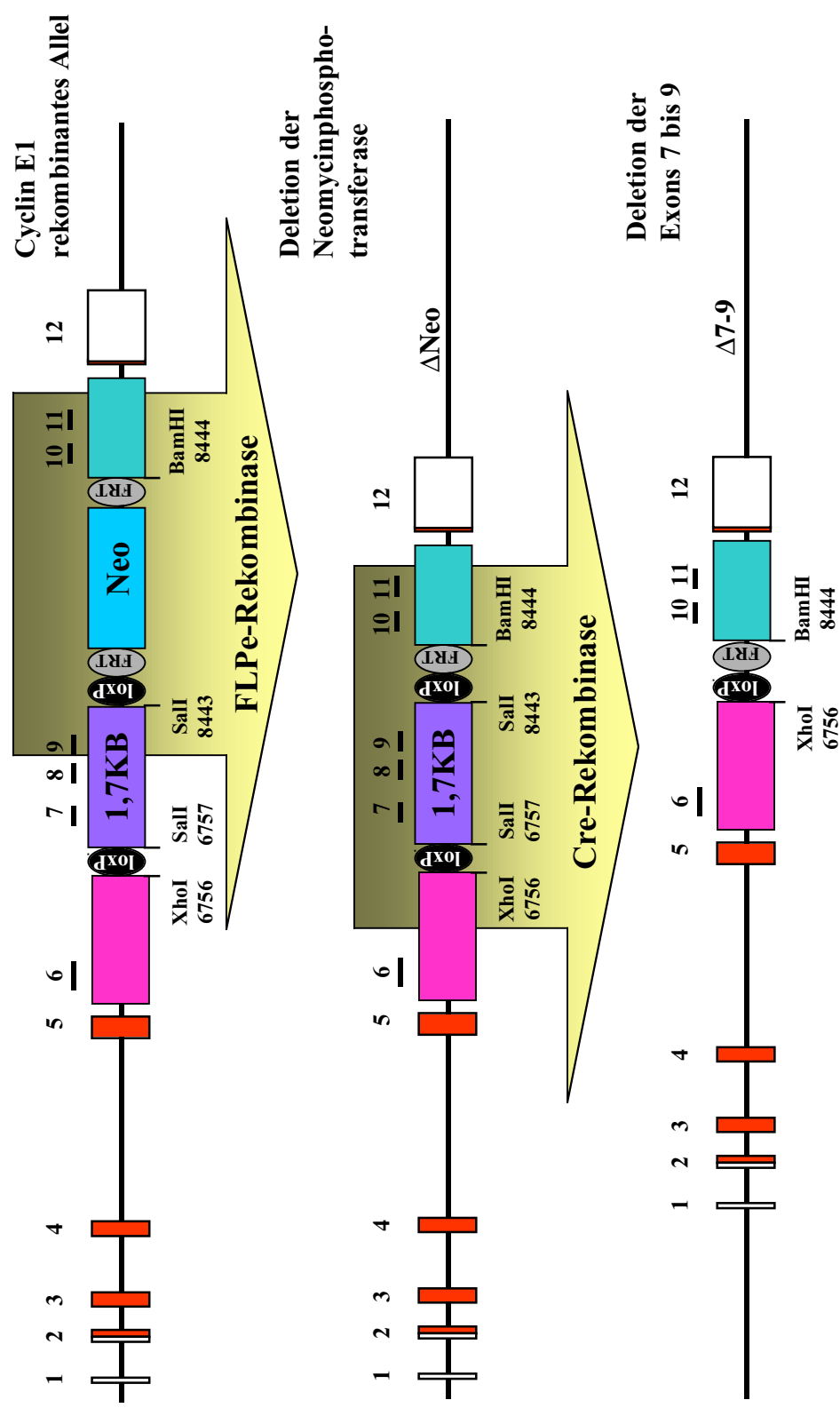


Abbildung 27: Konzeption zur Deletion der FRT-flankierten Neomycin-Kassette und zur Inaktivierung des Cyclin E1-Gens *in vivo*. Durch Verpaarung von Mäusen, die ein rekombinantes Cyclin E1-Allel tragen, mit transgenen Tieren, die ubiquitär die Rekombinase FLPe exprimieren, entstehen Nachkommen, die beide Merkmale vereinen. Diese Nachkommen erzeugen dann Keimzellen, deren Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Cyclin E1-Allel (Δ Neo) entfernt wurde, so daß das Δ Neo-Allel an die nächste Generation weitergegeben werden kann. Werden durch weitere Verpaarungen Mäuse erzeugt, die neben dem Δ Neo-Allel auch transgen für die Cre-Rekombinase sind, so kann in diesen Tieren das Cyclin E1-Gen durch Deletion der loxP-flankierten Exons 7-9 inaktiviert werden ($\Delta 7-9$).

5. 2. 4 **Zweite Konzeption eines konditionalen Cyclin E1-Knockouts**

5. 2. 4. 1 **Herstellung des 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors**

Mit der Kenntnis über die vollständige murine Cyclin E1-Genstruktur und unter Verwendung des Basisvektors pNeoFlirt wurde der 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor konzipiert und hergestellt (Abb. 26). Alle notwendigen PCR-Reaktionen wurden mit genomischer DNA des Mausstammes 129Ola als Template durchgeführt. Nach Zwischenklonierung der PCR-Produkte in pCR2.1 erfolgte eine Sequenzierung, um Fehler in kodierenden Genabschnitten zu vermeiden.

Die Inaktivierung des Cyclin E1-Gens sollte durch die induzierbare Deletion der Exons 7-9 ($\Delta 7-9$) mit ca. 1,7 KB Größe erfolgen, wodurch die Cyclin-Box weitgehend eliminiert wird (Abb. 26). Die $\Delta 7-9$ -Deletion führt zu einer Verkürzung der mRNA, ohne den offenen Leserahmen zu verschieben (Abb. 25A). Es sollte noch ein Protein von 283 Aminosäuren gebildet werden, daß um 125 Aminosäuren kleiner ist als das Wildtyp-Protein (Abb. 25B). Der zu deletierende Bereich von Exon 7-9 wurde mittels PCR mit den Primern Box forward/ Box reverse, an die *SalI*-Schnittstellen angefügt worden waren, aus 129Ola-DNA amplifiziert. Über die *SalI*-Schnittstellen erfolgte die Insertion des Exon7-9-Abschnitts zwischen die loxP-Erkennungssequenzen in pNeoFlirt (Abb. 26). Der 5' Homologiearm wurde so konzipiert, daß zu seiner Ligation in pNeoFlirt die endogene *XhoI*-Schnittstelle an der Position 6756 des Cyclin E1-Gens benutzt werden konnte. Der 5' Homologiearm wurde ebenfalls durch PCR mit den Primern Left forward/Left reverse erzeugt und umfaßte ca. 3 KB der genomischen Cyclin E1-Sequenz inklusive der Exons 5 und 6. Das PCR-Produkt wurde zur Sicherung in den Vektor pCR2.1 zwischenkloniert. Eine in der Polylinkerregion dieses Vektors vorhandene *XhoI*-Schnittstelle, die sich in unmittelbarer Nähe des 5' Endes des Homologiearms befand, und die endogene *XhoI*-Schnittstelle dienten zur Einfügung des 5' Homologiearms in pNeoFlirt.

Mit den Primern Right forward/Right reverse, an die eine *BamHI*- bzw. *NotI*-Schnittstellen angefügt worden waren, wurde der ca. 3,0 KB große 3' Homologiearm amplifiziert. Dieser beinhaltet die genomische Sequenz der Exons 10-12 von Cyclin E1 und einen außerhalb des Gens gelegenen DNA-Abschnitt. Der 3' Homologiearm wurde über die *BamHI*- und *NotI*-Schnittstelle 3' der Neomycin-Kassette in den Vektor eingebaut (Abb. 26).

Parallele Experimente hatten Zweifel an der optimalen Funktionsfähigkeit des im pEasyFlox vorhandenen PGK-Neomycinphosphotransferase-Gens bestätigt, so daß auch eine Veränderung der Neomycin-Kassette als letzter Klonierungsschritt durchgeführt wurde. Hierzu wurde das Neomycinphosphotransferase-Gen unter Kontrolle des HSVTK-Promotor über *NheI*- und *XbaI*-Schnittstellen aus dem Vektor pTV-0 ausgeschnitten. Dieses ca. 1,1 KB große DNA-Fragment wurde in eine kompatible *SpeI*-Schnittstelle im PGK-Promotor der Neomycin-Kassette von pNeoFlirt inseriert. Die korrekte Insertion aller Teile des 2. Gen-Targeting-Vektors und die Integrität der loxP- und FRT-Erkennungssequenzen wurden durch Sequenzierung überprüft.

Es wurde angestrebt, daß rekombinante Cyclin E1-Allel, daß durch homologe Rekombination des 2. Gen-Targeting-Vektors mit dem Cyclin E1-Gen in ES-Zellen entstehen sollte, vom Wildtyp-Allel nach *EcoRI*-Verdau durch Southern Blot-Analyse

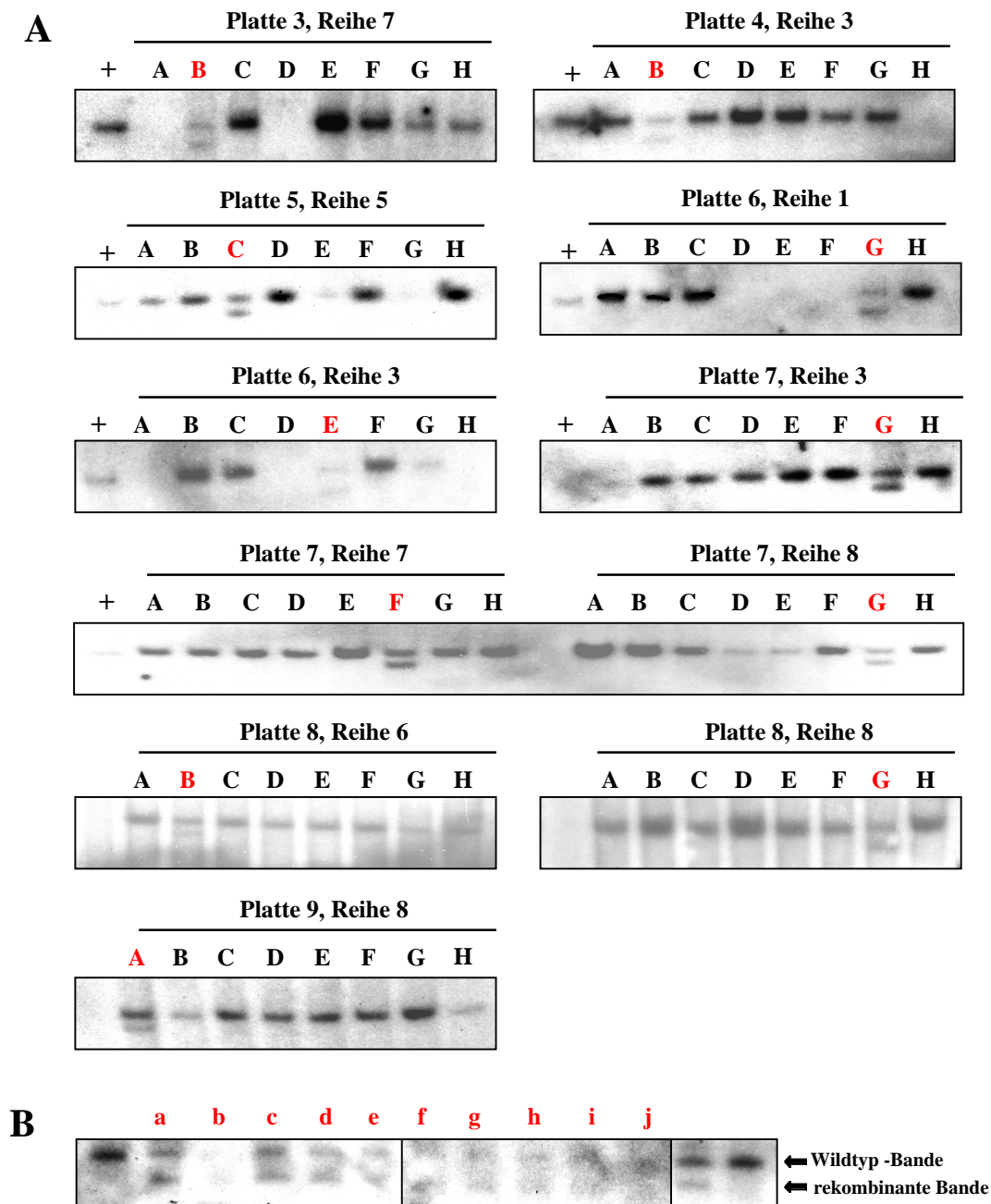


Abbildung 28: Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone. **A** Primäre Analyse von ES-Zellklonen auf 96-Well-Platten; die ES-Zell-DNA wurde mit *Eco*RI gespalten, Southern Blots durchgeführt und mit der radioaktiven Sonde S1 hybridisiert; die Wildtyp-Bande hatte eine Größe von ca. 5,7 KB im Vergleich zur rekombinanten Bande mit ca. 4,8 KB. **B** Sekundäre Analyse der primär als rekombinant erkannten Klone. +: 129Ola-Wildtyp-DNA als Positivkontrolle **rot**: rekombinante Klone: **a** Klon 3B7, **b** Klon 4B3, **c** Klon 5C5, **d** Klon 6G1, **e** Klon 6E3, **f** Klon 7G3, **g** Klon 7F7, **h** Klon 7G8, **i** Klon 8B6, **j** Klon 8G8, **k** Klon 9A8

und Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde unterscheiden zu können (Abb. 26). Zu diesem Zweck wurden zwei Sonden mittels PCR hergestellt und auf ihre Funktionsfähigkeit an *EcoRI*-verdauten Wildtyp-DNAs verschiedener Mausstämmen getestet. Die Sonde S1 (Abb. 26), die mit einer Länge von 545 bp stromaufwärts außerhalb des Cyclin E-Gens und extern des 3' Homologiearms hybridisierte, detektierte spezifisch die Wildtypbande mit der erwarteten Größe von ca. 5,7 KB (Abb. 26). Die Fragmentgröße für das rekombinante Allel war mit ca. 4,8 KB errechnet worden.

5. 2. 4. 2 Elektroporation, Selektion und Identifizierung des rekombinanten Cyclin E1-Allels in E14TG2a-Zellen

Der *ClaI*-linearisierte 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor wurde durch Elektroporation in ES-Zellen der Linie E14TG2a, die aus 129Ola-Embryonen stammten, transfiziert. Die ES-Zellen wurden anschließend durch G418 (400µg/ml) und Ganciclovir selektioniert, um ES-Zellklone ohne oder mit zufälliger Integration des Gen-Targeting-Vektors zu eliminieren. ES-Zellen mit rekombinanten Cyclin E1-Allel wurden durch dieses Vorgehen um den Faktor 20 angereichert. In zwei Ansätzen wurden 400 bzw. 500 ES-Zellklone isoliert und anschließend auf homologe Rekombination durch *EcoRI*-Verdau, Southern Blot und Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde S1 getestet. Bei 2 Klonen aus dem ersten Ansatz (Effizienz 0,5%) und bei 9 Klonen aus dem zweiten Ansatz (Effizienz 1,8%) trat neben dem Wildtyp-Allel auch eine zweite Bande für das rekombinante Allel auf (Abb. 28A). Dieser Befund wurde durch eine zweite Analyse bestätigt (Abb. 28B).

5. 2. 4. 3 Erzeugung chimärer Mäuse

Rekombinante ES-Zellen der Klone 3B7 und 6E3 wurden zur Injektion in Blastozysten aus C57BL/6-Mäusen ausgewählt. 80 C57BL/6-Weibchen wurden verpaart. Aus 8 dieser Tiere wurden 40 Blastozysten und späte Morula-Stadien gewonnen. Für jede ES-Zelllinie standen daher 20 Blastozysten zur Verfügung, in die jeweils 15-20 ES-Zellen injiziert wurden. Jeweils 10 injizierte Blastozysten pro Tier wurden in Ammenmäuse implantiert.

Es wurden drei chimäre, männliche Nachkommen der Linie Cyclin E1-3B7 geboren, die allerdings maximal bis zu 40% chimär waren. Die Linie Cyclin E1-6E3 ergab ebenfalls drei chimäre Nachkommen, zwei männliche Tiere und ein Zwitter, die allerdings hochchimär waren.

Der Test auf Keimbahntransmission des rekombinanten Cyclin E1-Allels erfolgte durch Verpaarung jeweils eines chimären Männchens pro Linie mit 129Ola-Weibchen. Nachkommen mit einheitlich braunem Haarkleid zeigen die Keimbahntransmission des rekombinanten Cyclin E1-Allels an. Es konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Allel der Mauslinie Cyclin E1-6E3 vererbt wird und zum Aufbau einer Cyclin E1/loxP-Mauslinie dient.

6 Diskussion

6.1 Einfluß von Cyclin E1-Spleißvarianten auf die Regulation des Zellzyklus von Hepatozyten

6. 1. 1 Rolle von Cyclin E1-Isoformen in der Hepatokarzinogenese

6. 1. 1. 1 Induktion der Cyclin E1-Expression in transgenen HCCs

Um die Frage zu klären, ob die Zellzyklusregulation in murinen Hepatozyten der Maus durch unterschiedliche Spleißvarianten des Cyclin E1-Gens beeinflusst werden kann und ob charakteristische Expressionsmuster identifizierbar sind, wurde die Cyclin E1-Expression in hepatozellulären Karzinomen (HCC) in den transgenen Mauslinien AAT/c-myc und EGF-2B untersucht.

Es ist gezeigt worden, daß die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-myc in humanen und murinen Lebern entscheidend zur Entwicklung und Progression von Tumoren beiträgt (PITOT, 1990; GRISHAM, 1996; LUTZ, LEON und EILERS, 2002; NILSSON und CLEVELAND, 2003). In der Mauslinie AAT/c-myc steuert der $\alpha 1$ -Antitrypsinpromotor die hepatozyten-spezifische Überproduktion des murinen c-myc, das die Bildung von HCCs innerhalb von 12-15 Monaten auslöst (DALEMANS et al, 1990; PERRAUD, 1991).

Der Wachstumsfaktor EGF stimuliert die Zellteilung von Hepatozyten *in vitro* (HOFFMANN, PIASECKI und PAUL, 1989). Das hier verwendete Tiermodell basiert auf der Expression einer sekretierbaren Form des humanen EGF in der Mauslinie EGF-2B, die nach einer Latenzzeit von 9-12 Monaten HCCs entwickelt (TÖNJES et al, 1995; STENZEL, 1997; KLOCKE et al, 2002).

Werden sowohl IgEGF als auch c-myc in Hepatozyten doppeltransgener Mäuse expimiert, resultiert aus der Kooperation der Onkogene ein schnelleres Tumorstadium der HCCs, so daß die Tiere aus Tierschutzgründen bereits nach 6 Monaten getötet werden müssen. Die gleichzeitige Einschleusung von zwei genetischen Veränderungen ahmt die natürliche Akkumulation von Gendefekten nach, die zu einer beschleunigten neoplastischen Transformation führen (KINZLER und VOGELSTEIN, 1996). Die Mauslinien AAT/c-myc und EGF-2B sind zwar bezüglich ihres karzinogenen Potenzials gut charakterisiert worden, jedoch wurden die Cyclin E1-Expression in daraus abgeleiteten Tumoren bisher nicht analysiert.

Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß in den HCCs und im transgenen, nicht-neoplastischen Leberparenchym unabhängig vom Transgen insgesamt eine deutlich höhere Expression von Cyclin E1 vorlag als in nicht-proliferierenden Lebergeweben aus Wildtyp-Mäusen. Neben Wildtyp-Cyclin E1 wurden die mRNA-Varianten IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ in den HCCs expimiert, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals in murinen Zellen identifiziert wurden.

Die höhere Cyclin E1-Expression des murinen, proliferierenden Lebergewebes im Vergleich zu nicht-proliferierendem Lebergewebe stimmt mit Befunden zur humanen Hepatokarzinogenese überein. In 27-68% der untersuchten humanen Lebertumoren

wurde eine Überexpression von Wildtyp-Cyclin E1 festgestellt (PENG, CHOU und HSU, 1998; KIM et al, 2000; KOHZATO, 2001; JUNG et al, 2001; OHASHI et al, 2001; ARMENGOL et al, 2003; ZHOU, HE und LIANG, 2003). In den myc-transgenen Mäusen lag bereits im nicht-neoplastischen Lebergewebe ein Anstieg der Cyclin E1-Expression vor. Auch in der humanen Hepatokarzinogenese wurde eine erhöhte Cyclin E1-Expression in frühen Stadien der Tumorentstehung nachgewiesen, die häufig mit einer verminderten Expression des G1-Inhibitors p27 verbunden war (PENG, CHOU und HSU, 1998; ARMENGOL et al, 2003; ZHOU, HE und LIANG, 2003). Außerdem diente die Cyclin E1-Überexpression dazu, die Proliferationsinhibition durch eine gesteigerte p21-Konzentration zu überwinden (TSUJI et al, 1998). Der frühe Anstieg der Expression von Cyclin E1 in transgenen Hepatozyten ist daher als frühes Ereignis in der Hepatokarzinogenese anzusehen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die direkte Bindung von c-myc an den Cyclin E1-Promotor eine dreifache Stimulation der Cyclin E1-Transkription verursacht (JANSEN-DÜRR et al, 1993).

In den EGF-transgenen murinen HCCs wurde generell ein deutlicher Anstieg der Cyclin E1-Konzentration gegenüber nicht-proliferierendem Wildtyp-Lebern beobachtet. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, daß die von EGF ausgelöste Signaltransduktions-Kaskade die Proliferation von murinen Hepatozyten *in vivo* durch die Stimulation der Cyclin E1-Expression beeinflusst. Dieses Ergebnis widerlegt Befunde an Hepatozyten *in vitro*. Laut Alisi und Kollegen führte die EGF-Stimulation von primären Hepatozyten aus der Ratte zu einer Reduktion der Expression von Cyclin E1 und der Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und p27, die mit einem Anstieg der Konzentration von Cyclin D1 und Cyclin A verbunden war (ALISI et al, 2003). Loyer und Mitarbeiter beobachteten in Hepatozyten nach EGF-Applikation einen gleichbleibenden Cyclin E1-Expression und eine erhöhte Aktivität der Cyclin E1/cdk2-Komplexe (LOYER et al, 1996; NELSON et al, 2001).

In den doppeltransgenen HCCs ist die simultane Expression von c-myc und EGF mit einem weiteren Anstieg der Cyclin E1-Expression gegenüber den einfach-transgenen Tumoren verbunden. Dadurch wird vermutlich die Beschleunigung des Tumorstwachstums verursacht oder zumindest unterstützt (LIAO et al, 2000). Befunde an humanen HCCs und an Hepatomzellen *in vitro* bestätigen, daß ein hohes Expressionsniveau von Cyclin E1 mit einem beschleunigten Übergang der Zellen von der G1 in die S-Phase der Mitose (RESNITZKY et al, 1994; WIMMEL et al, 1994) und einer erhöhten Zellteilungsrate korreliert (YERLY-MOTTA et al, 1999; OHASHI et al, 2001). Cyclin E1 ist aber nicht der Faktor, der das Größenwachstum der Tumoren endgültig determiniert, da sowohl in den untersuchten murinen Tumoren als auch in humanen HCCs die Überexpression des Cyclin E1-Gens nicht mit der Tumorgroße korreliert.

6. 1. 1. 2 Einfluß der Isoformen IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ der Cyclin E1-mRNA auf die Tumorprogression

In den murinen HCCs wurden neben der Wildtypform der Cyclin E1-mRNA alternativ gespleißte Varianten IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ erstmals identifiziert. Eine Abhängigkeit des Expressionsmusters der Varianten vom induzierenden Transgen oder der Tumorgroße bestand nicht. Bereits im nicht-neoplastischen Lebergewebe wurden die verkürzten Cyclin E1-Isoformen gebildet. Dabei exprimierten langsam wachsende Tumoren aus

einfach-transgenen Tieren die verkürzten Varianten $\Delta 4$ und $\Delta 5$, während die schnell wachsenden Tumoren aus doppel-transgenen Mäusen bevorzugt die Wildtyp-Form der Cyclin E1-mRNA exprimierten. Es war also eine deutliche Verschiebung des Expressionsmusters von den verkürzten mRNA-Varianten $\Delta 4$ und $\Delta 5$ in den langsam wachsenden einfach-transgenen Tumoren zur Wildtyp-Form von Cyclin E1 in den schnell expandierenden doppel-transgenen HCCs zu beobachten. Vermutlich besitzt die Wildtyp-Form von Cyclin E1 eine höhere mitogene Aktivität als die Varianten $\Delta 4$ und $\Delta 5$ und trägt so maßgeblich zur Tumorprogression bei (vergleiche SAID und MEDINA, 1995). Im Prozeß der Leberregeneration in Ratten wurde gezeigt, daß nur die Wildtyp-Form des Cyclin E1-Proteins, nicht aber verkürzte Varianten die Kinaseaktivität im Komplex mit cdk2 vollständig induzieren (ALBRECHT et al, 1999). Humane Spleißvarianten von Cyclin E1, denen Exon 4 oder 5 fehlen, sind bisher nicht isoliert worden.

Ohtsubo und Mitarbeiter wiesen in humanen Krebszelllinien eine zur IN3-Variante der Maus analoge mRNA nach, die als Class 1 bezeichnet wurde. Auch in der Class 1-Isoform verursacht die Insertion eines Intronanteils zwischen Exon 2 und 3 eine Leserasterverschiebung zu einem ATG in Exon 3 (OHTSUBO et al, 1995). Eine konkrete Aufgabe dieser Varianten in Mensch und Maus wurde bisher nicht bestimmt. N-terminal trunkierte Cyclin E1-Proteine, die von artifiziellen Cyclin E1-mRNAs mit 5' Verkürzung translatiert wurden, wiesen eine erhöhte Transaktivierungsaktivität im Luciferase-Assay auf (KIM und KAELIN, 2001). Low molecular weight-Formen des humanen Cyclin E1-Proteins bilden nach proteolytischer Abspaltung des N-Terminus ebenfalls hyperaktive Komplexe mit cdk2 (PORTER et al, 2001; WANG et al, 2003). Daraus ergibt sich die Frage, welche biologische Funktion den mRNA-Varianten von Cyclin E1 im Kontext der Hepatokarzinogenese zuzuordnen ist.

Die funktionellen Untersuchungen der murinen Cyclin E1-Isoformen zeigten, daß nicht nur die Wildtyp-mRNA in ein Protein von 47 kDa Molekulargewicht umgesetzt wird sondern auch die Varianten IN3 und $\Delta 4$ in Proteine von 45 kDa bzw. 44 kDa translatiert werden. Diese Proteine konnten *in vitro* aktive Komplexe mit cdk2 bilden, das Substrat Histon H1 phosphorylieren und eine Autophosphorylierung durchführen. Letzteres ist die Voraussetzung für die Degradation von Cyclin E1 durch das Ubiquitin-Proteasom-System (WON und REED, 1996). Ein Unterschied in der Phosphorylierungsaktivität der cdk2-Komplexe mit Wildtyp-Cyclin E1 bzw. mit den Spleißvarianten IN3 oder $\Delta 4$ konnte nicht nachgewiesen werden. Daher kann die geringere Wachstumsgeschwindigkeit in einfach-transgenen HCCs, in denen diese Isoformen bevorzugt auftraten, nicht durch die Bildung weniger aktiver Komplexe dieser Cyclin E1-Varianten mit cdk2 begründet werden. Möglicherweise liegt der Zusammenhang in veränderten Substratspezifitäten dieser Komplexe. Für die $\Delta 48$ -Isoform des humanen Cyclin E1, der 48 Basenpaare des Exons 3 fehlen, wurde eine veränderte Substratspezifität in Bezug auf das Retinoblastoma-Protein nachgewiesen (PORTER und KEYOMARSI, 2000).

Die $\Delta 5$ -Variante der Cyclin E1-mRNA wurde nicht oder nur in sehr geringem Maße translatiert. Ein Protein mit dem entsprechenden Molekulargewicht von 33 kDa wurde im Western Blot *in vitro* nach transienter Transfektion der Varianten IN3 und $\Delta 5$ in Huh7-Zellen in geringer Menge detektiert. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Ob die $\Delta 5$ -Variante eine Funktion in der Steuerung des Zellzyklus hat, bleibt daher unklar.

Weitere Experimente sind notwendig, um die biologische Relevanz von $\Delta 5$ zu verifizieren.

Die Untersuchungen zu Expressionsmustern und Funktionen von Cyclin E1-Spleißvarianten in der Maus haben gezeigt, daß neben der Wildtyp-mRNA noch die Varianten IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ gebildet werden. Die Untersuchungen an murinen HCCs bestätigten, daß im besonderen die Wildtyp-Form von Cyclin E1 mit einer Beschleunigung der Zellzyklusprogression von Hepatozyten in Verbindung steht. Die Formen $\Delta 4$ und IN3 haben sich als funktionsfähige Cyclin E1-Derivate erwiesen. Hepatozelluläre Karzinome offenbarten erhöhte Expressionsniveaus dieser Varianten. Die durchgeführten Experimente erbrachten keine weitergehenden Erkenntnisse, welche Rolle die Cyclin E1-Isoformen IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ für die Steuerung des Zellzyklus in Hepatozyten haben.

6. 1. 2 Charakterisierung des G0-Zustandes von Hepatozyten durch die $\Delta 3/8$ -Variante von Cyclin E1

Um die Bedeutung der gewonnen Erkenntnisse zur Expression von Cyclin E1-Varianten zu verifizieren, wurden Expressionstudien zum Vorkommen von Cyclin E1 in nicht-proliferierenden Lebern von Wildtypmäusen durchgeführt. Die Varianten IN3, $\Delta 4$ oder $\Delta 5$ waren in G0-Lebern nicht nachweisbar. Stattdessen wurde eine neue, alternativ gespleißte mRNA-Isoform identifiziert und als $\Delta 3/8$ bezeichnet. Dieser Variante fehlt die kodierende Sequenz von Mitte des Exon 3 bis zur Mitte des Exon 8 inklusive NLS und Cyclin-Box. $\Delta 3/8$ wird in ruhenden Hepatozyten stärker exprimiert als die Wildtyp-mRNA von Cyclin E1. In der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wurde die Expression von $\Delta 3/8$ reziprok zum Anstieg der Konzentration von Wildtyp-Cyclin E1 vermindert, was auf eine zellzyklusabhängige Regulation der alternativen Spleißvorgänge schließen läßt. Eine der $\Delta 3/8$ -Isoform ähnliche mRNA-Variante wurde bisher in humanen Zellen nicht identifiziert.

In vitro wird $\Delta 3/8$ in ein Protein mit einem Molekulargewicht von 27 kDA translatiert, das inaktive Komplexe mit cdk2 bildete. FACS-Analysen an stabil transfizierten Zelllinien ergaben, daß die Expression von $\Delta 3/8$ den Wiedereintritt von Zellen aus dem G1-Arrest in den Zellzyklus nach Serumstimulation verzögert. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die $\Delta 3/8$ -Variante durch Fällung von cdk2 in inaktiven Komplexen in Zytoplasma zur Aufrechterhaltung des G0-Zustandes von Hepatozyten beiträgt.

Die Wildtyp-mRNAs von Cyclin E1 und E2 waren im Northern Blot in nicht-proliferierenden Lebern aus Mäusen bisher nicht nachweisbar (DAMJANOW et al, 1994; GENG et al, 2001). Die hier durchgeführten RT-PCR-Analysen zur Expression von Cyclin E1 zeigen klar, daß der Übertritt von Hepatozyten aus dem Zellzyklus in G0 oder der Zellzyklusarrest in G1 nicht mit einer vollständigen Hemmung, sondern nur mit einer deutlichen transkriptionellen Repression verbunden ist. RT-PCR-Analysen anderer Arbeitsgruppen bestätigen, daß in ruhenden Hepatozyten sowohl in G0 als auch im G1-Arrest nach Serumentzug die Wildtyp-mRNA von Cyclin E1 nachweisbar ist (MUMBERG, 1997; STÄRKEL et al, 2001). Passend zu diesen Befunden wurde im Rahmen von Leberregenerationsexperimenten, in denen das Cyclin E1-Protein als

Proliferationsmarker diene, in vielen G0-Lebern das Wildtyp-Protein von Cyclin E1 zumindest in geringen Menge gefunden (EHRENFRIED et al, 1997; JAUMOT et al, 1999; JEONG et al, 1999; PUJOL et al, 2000). Die geringe Expression der Cyclin E1-mRNA in G0 bzw. der frühen G1-Phase ist auf die aktive Repression der Transkription zurückzuführen (MAYOL et al 1996; SMITH et al, 1996; LE CAM et al, 1999; ZHANG et al, 2000; NIELSEN et al, 2001; POLANOWSKA et al, 2001; ZHANG et al, 2001; FABBRIZIO et al, 2002; MORRISON 2002).

Alternative Spleißmechanismen stellen eine weitere Form der Modifikation von Transkription und Aktivität des Cyclin E1 in ruhenden Zellen dar, wodurch funktionell inaktive Isoformen entstehen können. Nach Serumstimulation an G1-arretierten Zellen erreichte z.B. die humane Cyclin E1-Varinante E_T, die durch das Fehlen von Exon 9 funktionell inaktiv ist, ihr Expressionsmaximum Cyclin E-untypisch bereits in der frühen G1-Phase, während das Expressionsmaximum der Wildtyp-mRNA erst im G1/S-Übergang auftrat. In diesen Experimenten wurde erstmals gezeigt, daß alternative Spleißvorgänge der Cyclin E1-mRNA zellzyklusabhängig sind (MUMBERG et al, 1997). In diesen Kontext reihen sich auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Isoform $\Delta 3/8$ des murinen Cyclin E1 ein. Die $\Delta 3/8$ -Isoform wird in Hepatozyten hauptsächlich in G0 durch alternatives Spleißen gebildet und wird in der Leberregeneration zellzyklusabhängig reguliert. Während die Expression des Wildtyp-Cyclin E1 bis zu 36 Stunden nach partieller Hepatektomie gesteigert wurde (ALBRECHT et al, 1999; WÜSTEFELD et al, 2000; LÜDDE et al, 2001), nahm die Konzentration der $\Delta 3/8$ -Variante reziprok dazu ab. Der $\Delta 3/8$ Variante fehlt die Cyclin-Box, die essentiell für die Bindung von cdk2 durch Cycline ist. Daher muß postuliert werden, daß das *in vitro* translatierte Protein von $\Delta 3/8$ über einen unbekannten Mechanismus an cdk2 bindet. Die entstehenden $\Delta 3/8$ -cdk2-Komplexe besaßen daher keine Phosphorylierungsaktivität. In Brustkrebstumoren der Maus wurden ebenfalls stark verkürzte Cyclin E1-Proteine gefunden, die funktionell inaktiv waren (SAID und MEDINA, 1995). Möglicherweise wird in G0 die unreife mRNA von Cyclin E1 durch alternatives Spleißen in die $\Delta 3/8$ -Isoform umgewandelt, um Cyclin E1 funktionell zu inaktivieren und den G0-Zustand zu erhalten. Die bisherigen Ergebnisse lassen aber auch die Hypothese zu, daß $\Delta 3/8$ sogar eine dominant-negative Funktion als "Bewahrer" des G0-Zustandes hat. Cdk2 könnte durch Bindung an $\Delta 3/8$ inaktiviert und im Zytoplasma zurück gehalten werden, da $\Delta 3/8$ das nukleäre Lokalisationssignal fehlt. Gestützt wird diese Sichtweise durch die Ergebnisse von Li und Kollegen, die eine dominant-negative Isoform von Cyclin C mit trunkierter Cyclin-Box identifiziert haben (LI, LAHTI und KIDD, 1996). Cyclin C/cdk3-Komplexe sind ebenfalls an der Steuerung des G0-G1-Übergangs durch Rb-Phosphorylierung beteiligt (REN und ROLLINS, 2004).

Um die Hypothese einer dominant-negativen Wirkung von $\Delta 3/8$ zu verifizieren, wurden vergleichend Wildtyp-Cyclin E1 und $\Delta 3/8$ stabil in embryonale Mausfibroblasten transfiziert, um die Auswirkungen der Überexpression dieser Proteine auf den Wiedereintritt in den Zellzyklus zu bestimmen. Die Zellen wurden durch Serumentzug in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und danach durch Versorgung mit serumhaltigem Medium veranlaßt, den Zellzyklus fortzusetzen (vergleiche COOPER, 2003). Wie erwartet bewiesen FACS-Analysen, daß die Expression von exogenem Wildtyp-Cyclin E1 zusätzlich zum endogenen Protein zu einer Verkürzung der G1-Phase und zu einem schnelleren

Übertritt in die S-Phase führt (vergleiche OTHSUBO und ROBERTS, 1993; RESNITZKY et al, 1994; WIMMEL et al, 1994; RESNITZKY und REED, 1995). Die Expression von $\Delta 3/8$ in Konkurrenz zum endogenen Wildtyp-Cyclin E1 erzeugte eine deutliche Verzögerung in der G1-Phase und einen verzögerten Eintritt der Zellen in die S-Phase. Dieses Ergebnis unterstützt die Sichtweise, daß das $\Delta 3/8$ -Protein aktiv an der Erhaltung des nicht-proliferierenden Status von Zellen beteiligt ist. Auch die neuen Untersuchungen zur Funktion von Cyclin E1 und E2 an konstitutiven Doppelknockout-Mäusen unterstreichen die essentielle Bedeutung der E-Cycline für den Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Während in kontinuierlich proliferierenden Zellen muriner Embryonen das Fehlen der E-Cycline weitgehend durch andere Cyclin-Kinase-Komplexe kompensiert werden kann, ist der Wiedereintritt von Zellen aus dem G1-Arrest in den Zellzyklus in Abwesenheit der E-Cycline blockiert (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Durch die Depletion von Cyclin E1 und Cyclin E2 wird die Bildung des Pre-Replikationskomplexes verhindert, da die Rekrutierung der MCM-Proteine an den ORC unterbunden ist. Als Folge dessen kann die zelluläre DNA nicht repliziert werden und der Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus ist blockiert (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Über einen solchen Mechanismus kann auch $\Delta 3/8$ dominant-negativ auf den G0/G1-Übergang von Hepatozyten wirken. $\Delta 3/8$ bindet und inaktiviert cdk2, so daß auch Cyclin E2 nicht die Cyclin E1-Funktion übernehmen kann, da der Bindungspartner fehlt. Als Konsequenz unterbleibt die Bildung des Pre-Replikationskomplexes und die DNA-Replikation. Die dominant-negative $\Delta 3/8$ -Variante von Cyclin E1 besitzt daher womöglich analoge Wirkungen zum genomischen Knockout der E-Cycline in murinen Zellen.

6.2 Generierung einer konditionalen Cyclin E1-Knockout-Maus

Die Analogien der Expressionsprofile in embryonalen und adulten Zellen sowie der spezifischen Substrate bzw. Interaktionspartner begründeten die Hypothese einer funktionellen kompensatorischen Redundanz zwischen Cyclin E1 und E2 (DAMJANOW et al, 1994; LAUPER et al, 1998; ZARIWALA et al, 1998; GUDAS et al, 1999; GENG et al, 2001). Durch konstitutive Inaktivierung von Cyclin E1 oder Cyclin E2 in der Maus ist gezeigt worden, daß das Fehlen weder von Cyclin E1 noch von Cyclin E2 lethal ist. Der Cyclin E1-Knockout zeigt keinen Phänotyp. Die Cyclin E2-Defizienz führt zu einer Hypoplasie der Hoden und zur Sterilität männlicher Mäuse, die nicht durch Cyclin E1 kompensiert werden kann (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Diese Befunde bestätigen die Hypothese, daß zwischen Cyclin E1 und E2 eine weitgehende funktionelle Redundanz besteht. Homozygote, konstitutive Cyclin E1/E2-Doppelknockoutmäuse sind allerdings embryonal lethal, da schwerwiegende plazentale Fehlentwicklungen auftreten (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Durch tetraploide Komplementation konnte zwar der Plazenta-Defekt ausgeglichen werden, trotzdem starb die Hälfte der E1/E2-Knockout-Embryonen auf Grund von Mißbildungen der Aorta und der herznahen Blutgefäße intrauterin zwischen Tag 15,5 und 18,5 der Ontogenese, während die andere Hälfte postnatal verstarb (GENG et al, 2003; PARISI et al, 2003). Cyclin E1 und E2 sind demnach essentiell für die Entwicklung der Plazenta und wichtiger Teile des Herz-

Kreislauf-Systems des Embryos. Daher konnten bisher keine Erkenntnisse zur Auswirkung einer funktionellen Depletion der E-Cycline auf die Zellzyklusregulation in adulten Zellen gesammelt werden. Um die Folgen einer funktionellen Inaktivierung der E-Cycline in adulten Zellen insbesondere im Rahmen der Leberregeneration untersuchen zu können, sollten Mäuse mit einer Kombination aus dem konstitutiven Cyclin E2-Knockout mit einem konditionalen Cyclin E1-Knockout erzeugt werden. Eine konditionale Cyclin E1-Knockout-Maus sollte daher im Rahmen dieser Arbeit generiert werden.

6. 2. 1 Kritische Betrachtung des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Konzepts

Der limitierende Faktor, der die Herstellung eines Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors bestimmte, war die bei Beginn der hier beschriebenen Arbeit unvollständigen Sequenzinformation zum Cyclin E1-Gen der Maus. Zum damaligen Zeitpunkt war nur die genomische Sequenz für die Promotorregion und die Exons 1-6 des murinen Cyclin E1 bekannt (BOTZ et al, 1996). Auf dieser Grundlage wurde entschieden, das Exon 6 konditional zu deletieren und es daher zunächst mit loxP-Erkennungssequenzen zu flankieren. Dieser Ansatz erschien besonders zweckmäßig, da Exon 6 für den Anfang der Cyclin-Box (MRAIL-Motiv) kodiert. Die Vollständigkeit der Cyclin-Box des Cyclin E1-Proteins ist zur Bildung aktiver Komplexe mit cdk2 notwendig und bestimmt darüber hinaus die Substratspezifität der Komplexe (KOFF et al, 1992; NUGENT et al, 1993; DAMJANOV et al, 1994; NOBLE et al, 1997; HORTON und TEMPLETON, 1997).

Mit der Entscheidung das Exon 6 des Cyclin E1-Gens mit loxP-Erkennungssequenzen zu flankieren, standen zur Formierung des Homologiearms auf der 3' Seite von Exon 6 nur noch ca. 500 bp bekannter Cyclin E1-Sequenz zur Verfügung, während die Länge des 5' Homologiearms auf 3,5 KB festgelegt wurde. Untersuchungen zur Effizienz homologer Rekombinationsprozesse in embryonalen Stammzellen belegen, daß eine Verdopplung der Größe der homologen Bereiche im Gen-Targeting-Vektor zu einem 20fachen Anstieg der Zahl rekombinanter Klone führte (THOMAS und CAPECCHI, 1987). Bei diesen Experimenten von Thomas und Carpecchi betrug die Mindestlänge der Homologiearme jeweils 1,2 KB, während die Gesamtlänge der Homologiebereiche von 5,2 KB bis auf 10,3 KB gesteigert wurde.

Durch Manipulation mit dem 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Konstrukt war es nicht möglich, ES-Zellen mit rekombinantem Cyclin E1-Allel und deletierter Neomycin-Kassette zu generieren. Die Gründe hierfür sind in zwei Aspekten zu sehen. Zum einen offenbart der Vergleich mit den Arbeiten von Thomas und Capecchi (1987), daß die mangelhafte Rekombinationseffizienz des 1. Konstrukts wahrscheinlich auf der zu geringen Länge des 3' Homologiearms mit weniger als 500 bp und der zu geringen Homologie zum Cyclin E1-Lokus mit insgesamt 4,0 KB beruht (vergleiche THOMAS und CAPECCHI, 1987). Zum anderen haben die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Deletion der Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Cyclin E1-Allel gezeigt, daß nach Expression der Cre-Rekombinase hauptsächlich das loxP-flankierten Exon 6 zusammen mit der loxP-flankierten Neomycin-Kassette deletiert wurde. Rekombinante ES-Zellen mit der gewünschten, ausschließlichen Deletion der Neomycin-Kassette wurden nicht identifiziert. Dieses Ungleichgewicht in der statistischen Verteilung der Deletionsereig-

nisse ist ein bekanntes Phänomen (dargestellt in KWAN, 2002). Durch frühere Untersuchungen zum konditionalen Gen-Targeting wurde empirisch belegt, daß durch Expression der Cre-Rekombinase in rekombinanten ES-Zellen die sogenannte Typ I-Deletion, d.h. die Deletion des loxP-flankierten Genabschnitts zusammen mit der Neomycin-Kassette, bevorzugt wird (dargestellt in KWAN, 2002).

Ursprünglich war geplant worden, in ES-Zellen der Linien Bruce4 aus C57BL/6-Mäusen ein rekombinantes Cyclin E1-Allel zu erzeugen. Daher waren die Homologiearme des 1. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektors auch auf Basis von isogener C57BL/6-DNA mittels PCR hergestellt worden. Im Rahmen paralleler Experimente zum Gen-Targeting des murinen Caspase-8-Gens hatte sich gezeigt, daß die zur Verfügung stehenden Bruce4-Zellen in Kultur sehr schnell in unerwünschte Differenzierungsprozesse eintraten. Auf diesen Zellen basierende Chimären zeigten ontogenetische Entwicklungsstörungen, waren steril und hatten eine deutlich verkürzte Lebenserwartung (C. LIEDTKE, D. RIETHMACHER, C. TRAUTWEIN, persönliche Mitteilung). Daher wurden die Bruce4-Zellen durch ES-Zellen der Linie R1 aus 129SV-Mäusen ersetzt (NAGY et al, 1993). In diesen Zellen konnte der Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor jedoch nicht homolog integriert werden. Ein mögliche Erklärung hierfür ergibt sich aus den Experimenten von Te Riele und Kollegen, die Untersuchungen zum Gen-Targeting des Retinoblastoma (RB)-Gens in ES-Zellen aus 129-Mäusen durchgeführt haben. Es wurde gezeigt, daß mit einem auf isogener DNA beruhendem Konstrukt eine 20fach höhere Rekombiantions-effizienz erzielt wurde als mit einem auf BALB/c-DNA basierendem Gen-Targeting-Vektor (TE RIELE, MAANDAG und BERNIS, 1992). Begründet wird dies mit Punktmutationen, kleinen Deletionen bzw. Insertionen und polymorphen CA-Wiederholungen, die in den RB-Allelen von BALB/c und 129SV differierten und die homologe Rekombination erschwerten. Allel-Polymorphismen des Cyclin E1-Gens zwischen C57BL/6 und 129SV sind bisher nicht untersucht worden. Allerdings ist bekannt, daß zwischen C57BL/6 und 129-Sublinien in 65% der untersuchten Loci Polymorphismen auftreten (SIMPSON et al, 1997; WADE et al, 2002). Es ist daher nicht auszuschließen, daß auch im Cyclin E1-Gen Polymorphismen die homologe Rekombination in ES-Zellen aus 129SV mit einem auf C57BL/6-DNA beruhendem Konstrukt erschwerten und in Kombination mit den zu gering dimensionierten Homologiebereichen letztlich verhinderten.

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, daß in drei Bereichen der Gen-Targeting-Strategie Optimierungen vorzunehmen waren:

1. Erhöhung der Homologie des Gen-Targeting-Vektors zum Cyclin E1-Lokus
2. Verwendung isogener, genomischer DNA zur Herstellung des Gen-Targeting-Konstrukts
3. Etablierung einer Methode zur selektiven Deletion der Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Allel

6. 2. 2 Optimierung der Cyclin E1-Gen-Targeting-Strategie

Vordringlich war die Deletion der Neomycin-Kassette aus dem rekombinanten Allel zu optimieren. Die Überlegung, die Neomycin-Kassette nicht zu deletieren sondern im Intron zu belassen, wurde verworfen, da eine negative Interferenz mit Spleißprozessen und damit ein vorzeitiger Funktionsverlust des Zielgens nicht auszuschließen war wie dies bereits für verschiedene Gene publiziert ist (dargestellt in LEWANDOWSKI, 2001). Daher wurde im 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Konstrukt der herkömmliche 3loxP-Ansatz durch ein 2loxP-2FRT-System ersetzt (dargestellt in KWAN, 2002). Die Neomycin-Kassette wird dabei mit FRT-Erkennungssequenzen flankiert, so daß durch Expression der FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* selektiv nur die Neomycin-Kassette deletiert wird. Die FLP-Rekombinase kann wahlweise *in vitro* in rekombinanten ES-Zellen oder *in vivo* durch Verpaarung der Cyclin E1/loxP-Mäuse mit FLP-transgenen Mäusen erst in den Nachkommen exprimiert werden (Abb. 26) (DYMECKI, 1996; FARLEY et al, 2000; RODRIGUEZ et al, 2000; TAKEUCHI et al, 2002). Letztere Variante bietet außerdem den Vorteil, daß die ES-Zellen aufgrund minimaler Manipulationsvorgänge nur kurz in Kultur gehalten werden. Dadurch wird die Integrationsfähigkeit der ES-Zellen in den Embryo und die Fähigkeit zur Keimbahntransmission verbessert (dargestellt in KWAN, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Mäuse der Linie B6;J-TgN (ACTFLPe) 9250Dym, die die FLPe-Rekombinase unter Steuerung des humanen β -Actin-Promotors ubiquitär exprimieren (FARLEY et al, 2000; RODRIGUEZ et al, 2000) eingesetzt. Die FLPe-Rekombinase ist ein gentechnisch verändertes Enzym, das bei 37°C eine 4fach höhere Aktivität aufweist als der FLP-Wildtyp, dessen Aktivitätsmaximum bei 30°C liegt. Die Rekombinationseffizienz der FLPe-Rekombinase ist der der Cre-Rekombinase vergleichbar (BUCHHOLZ, ANGRAND und STEWART, 1998). Außerdem sind für die FLP-Rekombinase im Gegensatz zur Cre-Rekombinase keine negativen Auswirkungen auf das Genom eukaryontischer Zellen bekannt. Die Expression der Cre-Rekombinase verursacht durch Nutzung von cryptischen loxP-Erkennungssequenzen in Hefen unerwünschte Crossing-over-Ereignisse während der Mitose. Auch im Genom von Säugerzellen werden Pseudo-loxP-Erkennungssequenzen von der Cre-Rekombinase erkannt, was *in vitro* zu Wachstumsstörungen und erhöhter Apoptoserate durch chromosomale Abberationen und Rearrangements führt. (SCHMIDT et al, 2000; LOONSTRA et al, 2001). Das 2loxP-2FRT-System bietet hier den Vorteil, daß die chromosomale Integrität der ES-Zellen *in vitro* nicht durch Cre-induzierte DNA-Schäden beeinträchtigt wird. Negative Auswirkungen der FLP-Expression auf das Genom von Säugerzellen wurden bisher nicht beschrieben.

Entsprechend der 2loxP-2FRT-Strategie wurde der für das 1. Konstrukt verwendete Basisvektor pEasyFlox modifiziert. Durch Substitution der die Neomycin-Kassette flankierenden loxP-Erkennungssequenzen durch FRT-Erkennungssequenzen wurde der Basisvektor pNeoFlirt neu formiert. Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente belegen die Funktionsfähigkeit der FRT-Erkennungssequenzen von pNeoFlirt *in vitro*. *In vivo* bestätigten die Experimente zur Etablierung einer konditionalen Caspase-8-Knockout-Maus die Funktionalität der FRT-Erkennungssequenzen (C. LIEDTKE, D. RIETHMACHER, C. TRAUTWEIN, persönliche Mitteilung). Mit einem auf pNeoFlirt basierenden Caspase-8-Gen-Targeting-Konstrukt wurden ES-Zellen manipuliert und

Mäuse mit rekombinantem Caspase-8-Allel etabliert. Nach Verpaarung dieser Tiere mit der FLPe-transgenen Maus wurden Nachkommen identifiziert, die ein rekombinantes Caspase-8-Allel mit Deletion der Neomycin-Kassette trugen und vererben konnten (C. LIEDTKE, D. RIETHMACHER, C. TRAUTWEIN, persönliche Mitteilung). Daher sollte auch die Funktionalität eines auf pNeoFlirt beruhendem Cyclin E1-Gen-Targeting-Konstrukt prinzipiell gegeben sein.

Der Vektor pNeoFlirt diente als Grundgerüst zur Herstellung des 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Konstrukts, daß zur Manipulation von aus männlichen 129Ola-Embryonen stammende ES-Zellen der Linie E14TG2a verwendet werden sollte. Alle notwendigen genomischen DNA-Abschnitte des Cyclin E1-Gens wurden daher auf Basis von isogener 129Ola-DNA mittels PCR amplifiziert. Negative Einflüsse durch Allel-Polymorphismen zwischen verschiedenen Inzuchtlinie der Maus wurden so von vorne herein ausgeschlossen.

Da zu diesem Zeitpunkt das murinen Cyclin E1-Gen vollständig sequenziert war, konnten die Homologiebereiche sowie der mit loxP-Erkennungssequenzen zu flankierenden Bereich optimal gestaltet werden. Die Länge der Homologiebereiche wurde auf insgesamt 6,0 KB erhöht, um eine gute Rekombinationseffizienz zu gewährleisten (THOMAS und CAPECCHI, 1987). Die Exons 7-9, die für den Hauptteil der Cyclin-Box und 47 c-terminal gelegene Aminosäuren kodieren, wurden mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Durch spätere Deletion des Exon 7-9 sollte mit hoher Sicherheit eine funktionelle Inaktivierung des Cyclin E1-Gens induziert werden. Neben der Cyclin-Box wird auch gleichzeitig das Exon 9 entfernt, dessen Deletion in der natürliche vorkommenden Spleißvariante E_T des humanen Cyclin E1 zur Ausschaltung der pro-mitogenen Cyclin-Funktion führt (MUMBERG et al, 1997).

Zur weiteren Optimierung wurde statt der bisherigen Neomycin-Kassette unter Kontrolle des PGK-Promotors die Neomycin-Kassette aus dem Vektor pTV-0, in der der HSVTK-Promotor die Expression der Neomycinphosphotransferase-Gens steuert, verwendet. Vergleichende Untersuchungen belegen die hohe Effizienz dieser Neomycin-Kassette in ES-Zellen *in vitro* (THOMAS und CAPECCHI, 1987; HEIKKINEN et al, 1999).

Die im 2. Cyclin E1-Gen-Targeting-Vektor eingebrachten Veränderungen waren erfolgreich. In zwei Elektroporationsserien an E14TG2a-Zellen wurden jeweils ca. 1000-1200 G418/Ganciclovir-resistente ES-Zellklone erzeugt. 11 der insgesamt 900 auf homologe Rekombination untersuchten Klone trugen ein rekombinantes Cyclin E1-Allel. Die Rekombinationsraten von 0,5% bzw. 1,8% in den beiden Serien entsprechen den Erwartungen (RAMIREZ-SOLIS, DAVIS und BRADLEY, 1993).

Zwei rekombinante Klone wurden für die Blastozysteninjektion ausgewählt. Aus der Blastozysteninjektion der rekombinanten Klone 3B7 und 6E3 gingen jeweils drei männliche Nachkommen hervor, die zu 40-80% chimär waren. Es wurden Verpaarungen der chimären Männchen mit 129Ola-Weibchen durchgeführten, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Keimbahntransmission des rekombinanten Cyclin E1-Allels ausgegangen werden konnte (RAMIREZ-SOLIS, DAVIS und BRADLEY, 1993). Dies wurde bestätigt, da das rekombinante Cyclin E1-Allel aus 6E3 an die Nachkommen vererbt wird und die rekombinanten Tiere die Basis für den Aufbau einer CyclinE1/loxP-Mauslinie bilden.

6.3 Ausblick

Die Ergebnisse zum Auftreten und Funktionen von mRNA-Isoformen des murinen Cyclin E1 zeigen auf, daß die Zellzyklusregulation im Übergang aus G0 oder dem G1-Arrest in den Zellzyklus sowie im G1/S-Übergang durch alternative Spleißvorgänge moduliert wird. Posttranslationale Prozessierungen zu LMW-Formen des Cyclin E1-Proteins sind an die maligne Transformation von Zellen gekoppelt. Die Veränderung der Eigenschaften von Cyclin E-Proteinen in Mensch und Maus durch alternatives Spleißen der mRNA stellt dagegen ein natürliches System dar, daß sowohl in somatischen als auch in transformierten Zellen von Bedeutung ist. Cyclin E-Proteine mit unterschiedlicher Aktivität, Substratspezifität und Stabilität sowie mit differierender zellulärer Lokalisation und unterschiedlichem temporärem Auftreten erlauben eine fein abgestimmte Koordination der von den Genen der Cyclin E-Familie gesteuerten Prozesse im Rahmen des Zellzyklus. Nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen werden besonders die Tumorprogression durch die Varianten IN3, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ gehemmt und der Wiedereintritt von Hepatozyten in den Zellzyklus durch die Isoform $\Delta 3/8$ verzögert. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die funktionelle Bedeutung dieser Varianten im Rahmen der Zellzykluskontrolle genauer zu bestimmen. Diese Befunde nährten auch die Hoffnung, diese alternativ gespleißten Isoformen womöglich als therapeutische Werkzeuge einsetzen zu können, um Tumorprogression zu verhindern oder zu verlangsamen. Dies setzt aber voraus, daß Cyclin E1 der unmittelbare und unverzichtbare Zellzykluskoordinator des G1/S-Übergangs ist. Die neuen Erkenntnisse, die an Cyclin E1/E2-Doppelknockout-Mäusen und der cdk2-Knockout-Maus gewonnen wurden, widerlegen diese bisher allgemein akzeptierte Annahme. Wie bereits einleitend beschrieben haben neue Untersuchungen an Cyclin E1, Cyclin E2 und cdk2-Knockoutmäusen ergeben, daß der Verlust von Cyclin E/cdk2-Komplexen in der Embryonalentwicklung weitgehend kompensiert werden kann. Für den Wiedereintritt in den Zellzyklus sind Cyclin E1 und E2 allerdings essentiell (BERTHET et al, 2003; GENG et al, 2003; ORTEGA et al, 2003; PARIZI et al, 2003). Dies bedeutet zum einen, daß die Spleißvarianten von Cyclin E1 nur bedingt therapeutisch nutzbar sind, da jede Form der Aktivitätsverminderung oder des Aktivitätsverlustes von Cyclin E1 und E2 durch andere Kinasekomplexe ausgeglichen werden kann. Zum anderen muß geklärt werden, welche Kinase-Komplexe im Rahmen der funktionellen kompensatorischen Redundanz Cyclin E/cdk2 ersetzen. Die funktionelle Redundanz innerhalb der G1-Cycline wurde bereits für die Substitution von Cyclin D1 durch Cyclin E1 beschrieben (GENG et al, 1999; BOWE et al, 2002; LEDDACCOLUMBANO et al, 2002) und dient Organismen allgemein zum Ausgleich lethaler Mutationen (GU et al, 2003). Als Substituent von Cdk2 scheidet Cdk3 aus, da diese Kinase in der Maus mutiert und inaktiv ist (YE et al, 2001). Andererseits identifizierten Matsuoka und Kollegen den bisher unbekannten, zellzyklusregulierten cdk3-Bindungspartner ik3-1 in der Maus (MATSUOKA et al, 2000). Cyclin A1 wird exklusiv nur in den Keimdrüsen exprimiert und der A1-Knockout ist nicht lethal (LIU et al, 1998). Daher rückt Cyclin A2 in den Mittelpunkt des Interesses, da Cyclin A2 ubiquitär exprimiert wird, der Cyclin A2-Knockout lethal ist und Cyclin A2 Komplexe mit cdk1 bildet (MURPHY et al, 1997). Es darf daher spekuliert werden, daß Cyclin E/cdk2 durch Cyclin A2/cdk1 ersetzt werden kann (ROBERTS und SHERR, 2003). Darüberhinaus kann aber auch die Beteiligung einer bisher unbekannten Kinase, die auch das Rb-Protein phos-

phoryliert, an der Regulation des G1/S-Übergangs nicht ausgeschlossen werden (LENTS und BALDASSARE, 2004). Es soll daher vordringlich an den Cyclin E1 und E2-Knock-out-Mäusen im Leberregenerationsmodell geklärt werden, ob zwischen Cyclin E1 und Cyclin E2 eine funktionelle Kompensation in adulten Zellen eintritt. Auch soll die Frage beantwortet werden, ob der Knockout von Cyclin E1 oder E2 die Hepatokarzinogenese in c-myc-transgenen Mäusen beeinflusst. Desweiteren wird angestrebt, durch Kombination des konstitutiven Cyclin E2-Knockouts mit der in dieser Arbeit etablierten konditionalen Cyclin E1-Knockouts Tiere zu erzeugen, an denen im Leberregenerationsmodell nach den Kinasen gesucht werden kann, die möglicherweise die Funktion des CyclinE/cdk2-Komplexes in adulten Hepatozyten der Maus übernehmen. Die Erkenntnisse aus diesen Experimenten dienen dazu, ein neues Verständnis der Zellzyklusregulation und speziell des G1/S-Übergangs zu erarbeiten, nachdem sich essentielle Regulationselemente und fundamentale Mechanismen als verzichtbar erwiesen haben.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	= <u>A</u> denin
ATCC	= <u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	= <u>A</u> denosin- <u>T</u> riphosphat
bp	= <u>B</u> asenpaar(e)
BES	= N,N-bis [2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BRCA	= <u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>A</u> ssociated
BSA	= <u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> blbumin
C	= <u>C</u> ytosin
CAF-1	= <u>C</u> hromatin <u>A</u> ssembly <u>F</u> actor-1
CMV	= <u>C</u> ytomegalievirus
cdk	= <u>C</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
cDNA	= <u>c</u> opy- <u>D</u> N <u>A</u>
dCTP	= <u>D</u> esoxy- <u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
DEPC	= <u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
dNTP	= <u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
DNA	= <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
DTT	= <u>D</u> ithiotreitol
<i>E.coli</i>	= <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
EDTA	= N,N;N',N'- <u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> ccetat
EGF	= <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
ES	= <u>E</u> mbryonale <u>S</u> tammzell-
Fa.	= Firma
FACS	= <u>F</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter
FCS	= <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
G	= <u>G</u> uanin
GFP	= <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
His	= <u>H</u> istidin
HSVTK	= <u>H</u> erpes <u>s</u> implex <u>V</u> irus <u>T</u> hymidin <u>K</u> inase
Ig	= <u>I</u> mmunglobulin
IPTG	= <u>I</u> sopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	= <u>K</u> ilobasenpaare
kDa	= <u>K</u> ilo- <u>D</u> alton
LIF	= <u>L</u> eukemia <u>I</u> nhibitory <u>F</u> actor

LMW	= <u>L</u> ow <u>M</u> olecular <u>W</u> eight
MCM	= <u>M</u> inimal <u>C</u> hromosome <u>M</u> aintenance
MEF	= <u>m</u> urine <u>e</u> mbryonale <u>F</u> ibroblasten
mRNA	= <u>m</u> essenger <u>R</u> NA
NPAT	= <u>N</u> uclear <u>P</u> rotein at the <u>A</u> T-Locus
OD	= <u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
ONPG	= <u>o</u> - <u>N</u> itrophenyl- β -D- <u>G</u> alactopyranosid
ORC	= <u>O</u> rig <u>i</u> n <u>R</u> ecog <u>n</u> ition <u>C</u> omplex
PAGE	= <u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgel- <u>E</u> lektrophorese
p.c.	= <u>p</u> ost <u>c</u> oitum
PCR	= englisch: <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PGK	= <u>P</u> hosphoglycerat- <u>K</u> inase
PH	= <u>p</u> artielle <u>H</u> epatektomie
PMSF	= <u>P</u> henylmethylsulfonylfluorid
RB	= Retinoblastoma
RNA	= englisch: <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid (Ribonukleinsäure)
RT	= <u>R</u> everse <u>T</u> ranskription
SC LC	= Small Cell Lung Carcinoma (Kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDS	= englisch: <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfat (Natriumdodecylsulfat)
TAE	= <u>T</u> ris/ <u>A</u> cetate/ <u>E</u> DTA
TEMED	= N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
T	= <u>T</u> hymidin
UV	= <u>u</u> ltraviolett
v/v	= Volumen pro Volumen
w/v	= Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt	= <u>W</u> ildtyp
x-Gal	= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
ZMNH	= <u>Z</u> entrum für <u>M</u> olekulare <u>N</u> eurobiologie <u>H</u> amburg

8 Literaturverzeichnis

Abbondanzo, S. J., Gadi, I. und C. L. Stewart: Derivation of embryonic stem cell lines, in: Wassarman, P. M. und M. L. DePamphilis (Ed.): *Methods in Enzymology*, Volume 225, Guide to techniques in mouse development, Academic Press, 1993, Seiten 803-823.

Adams, P. D., 2001: Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks, *Biochim Biophys Acta*, 1471: M123 - M133.

Albrecht, J. H., Rieland, B. M., Nelsen, C. J. und C. L. Ahonen, 1999: Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localization and p27 sequestration, *Am J Physiol*, 277: G1207 - G1216.

Alisi, A., Spagnuolo, S. und S. Leoni, 2003: Treatment with EGF increases the length of S-phase after partial hepatectomy in rat, changing the activities of cdks, *Cell Physiol Biochem*, 13: 239-248.

Armengol, C., Boix, L., Bachs, O., Sole, M., Fuster, J., Sala, M., Llovet, J. M., Rodes, J. und J. Bruix, 2003: P27^{KIP1} is an independent predictor of recurrence after surgical resection in patients with small hepatocellular carcinoma, *J Hepatol*, 38: 591-597.

Bandyopadhyay, D., Okan, N. A., Bales, E., Nascimento, L., Cole, P. A. und E. E. Medrano, 2002: Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes, *Cancer Res*, 62: 6231-6239.

Bazan, J. F., 1996: Helical fold prediction for the cyclin box, *Proteins*, 24: 1-17.

Bedrosian, I., Lu, K. H., Verschraegen, C. und K. Keyomarsi, 2004: Cyclin E deregulation alters the biologic properties of ovarian cancer cells, *Oncogene*, 239: 2648-2657.

Beijersberg, R. L. und R. Bernards, 1996: Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1287: 103-120.

Berchtold, M. W., 1989: A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res*, 17: 453.

Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. und P. Kaldis, 2003: Cdk2 knockout mice are viable, *Curr Biol*, 13: 1775-1785.

Birnboim, H. C. und J. Doly, 1979: A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-1522.

Bockkamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F. und B. Zabel, 2002: Of mice and models: improved animal models for biomedical research, *Physiol Genomics*, 11: 115-132.

Botz, J., Zerfass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Vogt, B., Eilers, M., Hatzigeorgiou, A. und P. Jansen-Dürr, 1996: Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promotor, *Mol Cell Biol*, 16: 3401 - 3409.

Bowe, D. B., Kenney, N. J., Adereth, Y. und I. G. Maroulakou, 2002: Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E, *Oncogene*, 21: 291-298.

Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J. und T. Hunt, 1998: Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4344-4349.

Buchholz, F., Angrand, P.-O. und A. F. Stewart, 1998: Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis, *Nature Biotech*, 16: 657-662.

Caceres, J. F. und A. R. Kornblihtt, 2002: Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease, *Trends in Genetics*, 16: 186-193.

Capecchi, M. R., 1989: Altering the genome by homologous recombination, *Science*, 244: 1288-1292.

Chen, C. und H. Okayama, 1987: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol Cell Biol*, 7: 2745-2752.

Cochet, O., Heard, D. J., Fehlbauer, P., Ducray, C. und L. Bracco, 2003: Exploiting human genomic diversity through alternative RNA splicing, *PharmaGenomics*, Jan 2003: 26-36.

Contreras, A., Hale, T. K., Stenoien, D. L., Rosen, J. M., Mancini, M. A. und R. E. Herrera, 2003: The dynamic mobility of histone H1 is regulated by cyclin/cdk phosphorylation, *Mol Cell Biol*, 23: 8626-8636.

Cooper, S. und J. A. Shayman, 2001: Revisiting retinoblastoma protein phosphorylation during the mammalian cell cycle, *Cell Mol Life Sci*, 58: 580-595.

Cooper, S., 2003: Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest point, *FASEB J*, 17: 333-340.

Coverley, D., Laman, H. und R. A. Laskey, 2002: Distinct roles for cyclin E and A during DNA replication complex assembly and activation, *Nature Cell Biol*, 4: 522-528.

- Dalemans, W., Perraud, F., Le Meur, M., Gerlinger, P., Courtney, M. und A. Pavirani, 1990: Heterologous protein expression by transimmortalized differentiated liver cell lines derived from transgenic mice, hepatomas/ α 1-antitrypsin/ONC mouse, *Biologicals*, 18: 191-198.
- Damjanow, I., Shan, J., Wang, R. F., Damjanow, A. und J. A. DeLoia, 1994: Molecular cloning and characterization of murine cyclin E, *Biochem Biophys Res Com*, 201: 994-1000.
- De Luca, A., De Falco, M., Baldi, A. und M. G. Paggi, 2002: Cyclin T: Three forms for different roles in physiological and pathological functions, *J Cell Physiol*, 194: 102-107.
- Dehne, S., Rohaly, G., Schub, O., Nasheuer, H.- P., Bohn, W., Chemnitz, J. Deppert, W. und I. Dornreiter, 2001: Two immunological distinct human DNA polymerase α -Primase subpopulations are involved in cellular DNA replication, *Mol Cell Biol*, 21: 2581-2593.
- Deng, C.-X., 2002: Roles of BRCA1 in centrosome duplication, *Oncogene*, 21: 6222-6227.
- Donovan, J. C. H., Rothenstein, J. M. und J. M. Slingerland, 2002: Non-malignant and tumor-derived cells differ in their requirements for p27^{Kip1} in Transforming Growth Factor- β -mediated G1 arrest, *J Biol Chem*, 277: 41686-41692.
- Dou, Q.-P., Levin, A. H., Zhao, S. and A. B. Pardee, 1993: Cyclin E and cyclin A as candidates for the restriction point protein, *Cancer Res*, 53: 1493-1497.
- Draetta, G. F., 1994: Mammalian G1 cyclins, *Curr Biol*, 6: 842-846.
- Dulic, V., Lees, E. und S. I. Reed, 1992: Association of human cyclin E with periodic G1-S phase protein kinase, *Science*, 257: 1958-1961.
- Dymecki, S. M., 1996: FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6191-6196.
- Ehrenfried, J. A., Ko, T. C., Thompson, E. A. und B. M. Evers, 1997: Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, *Surgery*, 122: 927-935.
- Ekholm, S. V., Zickert, P., Reed, S. I. und A. Zetterberg, 2001: Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point, *Mol Cell Biol*, 21: 3256-3265.
- Erlandson, F., Wählby, C., Ekholm-Reed, S., Hellström, A.-C., Bengtsson, E. und A. Zetterberg, 2003: Abnormal expression of cyclin E in tumour cells, *Int J Cancer*, 104: 369-375.

- Ewen, M. E., 2000: Where the cell cycle and histones meet, *Genes and Dev*, 14: 2265-2270.
- Fabrizio, E., Messaoudi, S. E., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J. R., Lee, J.-H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A. und C. Sardet, 2002: Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5, *EMBO reports*, 3: 641-645.
- Farley, F. W., Soriano, P., Steffen, L. S. und S. M. Dymecki, 2000: Widespread recombinase expression using FLP_eR, Flipper mice, *Genesis*, 28: 106-110.
- Fausto, N., 2000: Liver Regeneration, *J Hepatol*, 32: 19-31.
- Fearon, E. R., 1997: Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer, *Science*, 278: 1043-1050.
- Festing, M. F. W. : Origins and characteristics of inbred strains of mice, in: Lyon, M. F., Rastan, S. und S. D. M. Brown (Ed.): Genetic variants and strains of the laboratory mouse, Volume 2, Oxford University Press, 1996, Seiten 1537-1576.
- Fisk, H. A., Mattison, C. P. und M. Winey, 2003: Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 14875-14880.
- Furstenenthal, L., Kaiser, B. K., Swanson, C. und P. K. Jackson, 2001: Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication, *J Cell Biol*, 152: 1267 - 1278.
- Gao, G., Bracken, A. P., Burkard, K., Pasini, D., Classon, M., Attwooll, C., Sagara, M., Imai, T., Helin, K. und J. Zhao, 2003: NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression, *Mol Cell Biol*, 23: 2821-2833.
- Geisen, C. und T. Möröy, 2002: The oncogenic activity of cyclin E is not confined to cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein, *J Biol Chem*, 277: 39909-39918.
- Geng, Y., Eaton, E. N., Picon, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C. und R. A. Weinberg, 1996: Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein, *Oncogene*, 12: 1173-1180.
- Geng, Y., Whoriskey, W., Park, M. Y., Bronson, R. T., Medema, R. H., Li, T., Weinberg, R. A. und P. Sicinski, 1999: Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E, *Cell*, 97: 767-777.
- Geng, y., Yu, Q., Whoriskey, W., Dick, F., Tsai, K. Y., Ford, K. L., Biswas, D. K., Pardee, A. B., Amati, B., Jacks, T. Richardson, A., Dyson, N. und P. Sicinski, 2001:

Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13138-13143.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout III, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H. und P. Sicinski, 2003: Cyclin E ablation in the mouse, *Cell*, 114: 431-443.

Grana, X., Garriga, J. und X. Mayol, 1998: Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107, and p130 in the negative control of cell growth, *Oncogene*, 17: 3365-3383.

Grisham, J. W., 1996: Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment, *Carcinogenesis*, 18: 59-81.

Gu, H., Zou, Y.-R. und K. Rajewski, 1993: Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through cre-loxP-mediated gene targeting, *Cell*, 73: 1155-1164.

Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R. W. und W.-H. Li, 2003: Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations, *Nature*, 421: 63-66.

Gudas, J. M., Payton, M., Thukral, S., Chen, E., Bass, M., Robinson, M. O. und S. Coats, 1999: Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers, *Mol Cell Biol*, 19: 612 - 622.

Heikkinen, S., Pietilä, M., Halmekyto, M., Suppulo, S., Pirinen, E., Deeb, S. S., Jänne, J. und M. Laakso, 1999: Hexokinase II-deficient mice, *J Biol Chem*, 274: 22517-22523.

Helleday, T., 2003: Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells, *Mutat Res*, 532: 103-115.

Hendricks, K. B., Shanahan, F. und E. Lees, 2004: Role of BRG1 in cell cycle control and tumor suppression, *Mol Cell Biol*, 24: 362-376.

Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Taya, Y., Segawa, K., Nishimura, S. und M. Kitagawa, 1995: Differences in substrate specificity between cdk2-cyclin A and cdk2-cyclin E in vitro, *Biochem Biophys Res Com*, 216: 520-525.

Hinchcliffe, E. H. und G. Sluder, 2001: Centrosome duplication: Three kinases come up a winner!, *Curr Biol*, 11: R698-R701.

Hinchcliffe, E. H. und G. Sluder, 2002: Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling, *Oncogene*, 21: 6154-6160.

Hoffmann, B., Piasecki, A. und D. Paul, 1989: Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture, *J Cell Physiol*, 139: 654-662.

Hoffmann, I., Draetta, G. und E. Karsenti, 1994: Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition, *EMBO J*, **13**: 4302-4310.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und E. Lacy: Isolation, culture and manipulation of embryonic stem cells, in: *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Press, 1994, Seiten 253-290.

Horton, L. E. und D. J. Templeton, 1997: The cyclin box and c-terminus of cyclins A and E specify cdk activation and substrate specificity, *Oncogene*, **14**: 491-498.

Hubalek, M. M., Widschwendter, A., Erdel, M., Geschwendtner, A., Fiegl, H. M., Müller, H. M., Goebel, G., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Spruck, C. H., Reed, S. I. und M. Widschwendter, 2004: Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer, *Oncogene*, advanced online publication 29. März 2004, 6 Seiten.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. und G. J. Todaro, 1969: Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J Virology*, **4**: 549-553.

Jansen-Dürr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. und M. Eilers, 1993: Differential modulation of cyclin gene expression by myc, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 3685-3689.

Jares, P. und J. J. Blow, 2000: *Xenopus* Cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or Cdk activity and is required for XCdc45 loading, *Genes and Dev*, **14**: 1528-1540.

Jaumot, M., Estanyol, J.-M., Serratos, J., Agell, N. und O. Bachs, 1999: Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes, *Hepatology*, **29**: 385 - 395.

Jeong, J. S., Lee, J. H., Kim, H. I. und J. I. Park, 1999: Changes in expression of cell cycle regulators and their hepatic lobular distribution in partial hepatectomy-induced regenerating rat liver, *J Korean Med Sci*, **15**: 635 - 642.

Jia-Qing, L., Miki, H., Ohmori, M., Wu, F. und Y. Funamoto, 2001: Expression of Cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinomas, *Hum Pathology*, **32**: 945-953.

Jung, Y.-J., Lee, K.-H., Choi, D.-W., Han, C. J., Jeong, S. H., Kim, K.-C., Oh, J.-W., Park, T.-K. und C.-M. Kim, 2001: Reciprocal expressions of cyclin E and cyclin D1 in hepatocellular carcinoma, *Cancer Letters*, **168**: 57-63.

Kato, J., 1999: Induction of S phase by G1 regulatory factors, *Front Biosci*, **4**: d787-792.

Keller, C. und T. K., 2000: Requirement of Cyclin/cdk2 and protein phosphatase1 activity for chromatin assembly factor 1-dependent chromatin assembly during DNA synthesis, *J Biol Chem*, 45: 35512-35521.

Kelly, B. L., Wolfe, K. G. und J. M. Roberts, 1998: Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 2535-2540.

Keyomarsi, K. und A. B. Pardee, 1993: Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:1112-1116.

Keyomarsi, K., Conte Jr., D., Toyofuku, W. und M. P. Fox, 1995: Deregulation of cyclin E in breast cancer, *Oncogene*, 11: 941-950.

Keyomarsi, K., Tucker, S. L., Buchholz, T. A., Callister, M., Ding, Y., Hortobagyi, G. N., Bedrosian, I., Knickerbocker, C., Toyofuku, W., Lowe, M., Herliczek, T. W. und S. S. Bacus, 2002: Cyclin E and survival in patients with breast cancer, *N Engl J Med*, 347: 1566-1575.

Kim, H., Lee, M. J., Kim, M. R., Chung, I. P., Kim, Y. M., Lee, J. Y. und J.-J. Yang, 2000: Expression of cyclin D1, cyclin E, cdk4 and loss of heterozygosity of 8p, 13q, 17p in hepatocellular carcinoma: comparison study of childhood and adult hepatocellular carcinoma, *Liver*, 20: 173-183.

Kim, T.-Y. und W. G. Kaelin, Jr., 2001: Differential control of transcription by DNA-bound cyclins, *Mol Biol Cell*, 12: 2207-2217.

Kinzler, K. W. und B. Vogelstein, 1996: Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell*, 87: 159-170.

Kitamura, T., Watanabe, S. und N. Sato, 1998: Liver regeneration, liver cancer and cyclins, *J Gastroenterol Hepatol*, 13, Suppl., S96-S99.

Klocke, R., Gomez-Lechon, M. J., Ehrhardt, A., Mendoza-Figueroa, T., Donato, M. T., Lopez-Revilla, R., J. V. Castell und D. Paul, 2002: Establishment and characterization of immortal hepatocytes derived from various transgenic mouse lines, *Biochem Biophys Res Com*, 294: 864-871.

Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. und C. F. Lehner, 1994: Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation, *Cell*, 77: 107 - 120.

Koepp, D. M., Schaeffer, L. K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J. W. und S. J. Elledge, 2001: Phosphorylation-dependent ubiquitination of Cyclin E by the SCF/Fbw7 ubiquitin ligase, *Science*, 294: 173-177.

Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M. und J. M. Roberts, 1991: Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the cdc2 gene family, *Cell*, 66: 1217-1228.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B. R. und J. M. Roberts, 1992: Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle, *Science*, 257: 1689-1694.

Kohzato, N., Dong, Y., Sui, L., Kasaki, T., Nagahata, S., Nishioka, M., Konishi, R. und M. Tokuda, 2001: Overexpression of Cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas, *Hepatology Research*, 21: 27-29.

Krämer, A., Neben, K. und A. D. Ho, 2002: Centrosome replication, genomic instability and cancer, *Leukemia*, 16: 767-775.

Krude, T. und C. Keller, 2001: Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle, *Cell Mol Life Sci*, 58: 665-672.

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. und K. Rajewsky, 1995: Inducible Gene Targeting in mice, *Science*, 269: 1427-1429.

Kwan, K.-M., 2002: Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts, *Genesis*, 32: 49-62.

Kwon, T. K. und A. A. Nordin, 1998: Identification of the cdk2 binding sites on the p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor, *Oncogene*, 16: 755 - 762.

Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.

Lauper, N., Beck, A. R. P., Cariou, S., Richman, L., Hofmann, K., Reith, W., Slingerland, J. M. und B. Amati, 1998: Cyclin E2: a novel Cdk2 partner in the late G1 and S phase of the mammalian cell cycle, *Oncogene*, 17: 2637 - 2643.

Le Cam, L., Polanowska, J., Fabbrizio, E., Olivier, M., Philips, A., Eaton, E. N., Classon, M., Geng, Y. und C. Sardet, 1999: Timing of cyclin e gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex, *EMBO J*, 18: 1878-1890.

Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Williams, G. H., Lam, E. W.-F., Ibrahim, M. A. A., Mufti, G. J. und N. S. B. Thomas, 2003: Commitment point G0>G1 that controls entry into the cell cycle, *Mol Cell Biol*, 23: 2351-2361.

Ledda-Columbano, G. M., Pibiri, M., Concas, D., Cossu, C., Tripodi, M. und A. Columbano, 2002: Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli, *Hepatology*, 36: 1098-1105.

Lee, J., Tribble, G. und M. Jayaram, 2000: Resolution of tethered antiparallel and parallel Holliday junctions by the Flp site-specific recombinase, *J Mol Biol*, 296: 403-419.

Lengauer, C., Kinzler, K. W. und B. Vogelstein, 1998: Genetic instabilities in human cancers, *Natur*, 396: 643-649.

Lents, N. H. und J. J. Baldessare, 2004: Cdk2 and cyclin E knockout mice: lessons from breast cancer, *Trends Endocrinol Metabol*, 15: 1-3.

Lew, D. J., Dulic, V. und S. I. Reed, 1991: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin, CLN function in yeast, *Cell*, 66: 1197-1206.

Lewandowski, M., 2002: Conditional control of gene expression in the mouse, *Nature Reviews*, 2: 743-755.

Li, H., Lahti, J. M. und V. J. Kidd, 1996: Alternative spliced cyclin C mRNA is widely expressed, cell cycle regulated, and encodes a truncated cyclin box, *Oncogene*, 13: 705-712.

Liao, D. J., Natarajan, G., Deming, S. L., Jamerson, M. H., Johnson, M., Chepko, G. und R. B. Dickson, 2000: Cell cycle basis for the onset and progression of c-myc-induced, TGF α -enhanced mouse mammary gland carcinogenesis, *Oncogene*, 19: 1307-1317.

Lindhahl, T., Landberg, G., Ahlgren, J., Nordgren, H., Norberg, T., Klaar, S., Holmberg, L. und J. Bergh, 2004: Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer, *Carcinogenesis*, 25: 375-380.

Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, W. K., Guo, Q., Wang, P. und D. J. Wolgemuth, 1998: Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse, *Nature Genet*, 20: 377-380.

Loeb, D. M., Korz, D., Katsnelson, M., Burwell, E. A., Friedman, A. D. und S. Sukumar, 2002: Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression, *J Biol Chem*, 277: 19627-19632.

Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. und J. Jonkers, 2001: Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9209-9214.

Lovell-Badge, R. H.: Introduction of DNA into embryonic stem cells, in: Robertson, E. J. (Ed.): *Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1987, Seiten 153-182.

- Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodean, M., Baffet, G. und C. Guguen-Guillouzo, 1996: Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro, *J Biol Chem*, 271: 3256-3265.
- Lutz, W., Leon, J. und M. Eilers, 2002: Contribution of myc to tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta*, 1602: 61-71.
- Lüdde, T., Kubicka, S., Plümpe, J., Liedtke, C., Manns, M. P. und C. Trautwein, 2001: Ras adenoviruses modulate cyclin E protein expression and DNA synthesis after partial hepatectomy, *Oncogene*, 20: 5264-5278.
- Macaluso, M., Paggi, M. G. und A. Giordano, 2003: Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer, *Oncogene*, 22: 6472-6478.
- Maniatis, T. und B. Tasic, 2002: Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans, *Nature*, 418: 236-243.
- Matsuoka, M., Matsuura, Y., Semba, K. und I. Nishimoto, 2000: Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk3) in vivo, *Biochem Biophys Res Com*, 273: 442 - 447.
- Mayol, X., Garriga, J. und X. Grana, 1996: G1 cyclin/cdk-independent phosphorylation and accumulation of p130 during the transition from G1 to G0 leads to its association with E2F-4, *Oncogene*, 13: 237-246.
- Mazumder, S., Gong, B., Chen, Q., Drazba, J. A., Buchsbaum, J. C. und A. Almasan, 2002: Proteolytic cleavage of cyclin E leads to inactivation of associated kinase activity and amplification of apoptosis in hematopoietic cells, *Mol Cell Biol*, 22: 2398-2409.
- Michalopoulos, G. K. und M. C. DeFrances, 1997: Liver regeneration, *Science*, 276: 60-66.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R. und S. Kornbluth, 1999: Nuclear import of cdk/cyclin complexes: Identification of distinct mechanisms for import of cdk2/cyclin E and cdc2/cyclin B1, *J Cell Biol*, 144: 213-224.
- Moore, J. D., Kornbluth, S. und T. Hunt, 2002: Identification of the nuclear localization signal in Xenopus Cyclin E and analysis of its role in replication and mitosis, *Mol Biol Cell*, 13: 4388-4400.
- Morisaki, H., Fujimoto, A., Ando, A., Nagata, Y., Ikeda, K. und M. Nakanishi, 1997: Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase, cdk inhibitor by cyclin E/cdk2, *Biochem Biophys Res Com*, 240: 386 - 390.

- Morris, L., Allen, E. und N. B. La Thangue, 2000: Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators, *Nat Cell Biol*, 2: 232-239.
- Morrison, A. J., Sardet, C. und R. E. Herrera, 2002: Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome, *Mol Cell Biol*, 22: 856-865.
- Mumberg, D., Wick, M., Bürger, C., Haas, K., Funk, M. und R. Müller, 1997: Cyclin ET, a new splice variant of human cyclin E with the unique pattern during cell cycle progression and differentiation, *Nucleic Acids Res*, 25: 2098-2105.
- Murphy, M., Stinnakre, M.-G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C. und J. Sobczak-Thépot, 1997: Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene, *Nature Genet*, 15: 83-86.
- Murray, A. W., 2004: Recycling the cell cycle: Cyclins revisited, *Cell*, 116: 221-234.
- Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A. und K. Fukasawa, 2000: Syngistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression, *Oncogene*, 19: 1635-1646.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. und J. C. Roder, 1993: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8424-8428.
- Nagy, A., 2000: Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring, *Genesis*, 26: 99-109.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K. und J. Sato, 1984: Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, Huh-7, in long-term culture with chemically defined medium, *Jap J Cancer Res*, 75: 151-158.
- Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S. und K. Nakayama, 2001: Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27^{KIP1}, *Biochem Biophys Res Com*, 282: 853-860.
- Nelson, C. J., Hansen, L. K., Rickheim, D. G., Chen, C., Stanley, M. W., Krek, W. und F. H. Albrecht, 2001: Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp 2, *Oncogene*, 20: 1825-1831.
- Nelson, D. M., Ye, X., Hall, C., Santos, H., Ma, T., Kao, G. D., Yen, T. J., Harper, J. W. und P. D. Adams, 2002: Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity, *Mol Cell Biol*, 22: 7459-7472.

Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U.-M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Fierstein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. und T. Kouzarides, 2001: Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters, *Nature*, 412: 561-565.

Nilsson, J. A. und J. L. Cleveland, 2003: Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene*, 22: 9007-9021.

Nissim-Rafinia, M. und B. Kerem, 2002: Splicing regulation as a potential genetic modifier, *Trend in Genetics*, 18: 123-127.

Noble, M. E. M., Endicott, J. A., Brown, N. R. und L. N. Johnson, 1997: The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control, *Trends Biochem Sci*, 22: 482-487.

Nugent, J. H. A., Alfa, C. E., Young, T. und J. S. Hyams, 1991: Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis, *J Cell Sci*, 99: 669-674.

Ohashi, R., Gao, C., Miyazaki, M., Hamazaki, K., Tsuji, T., Inoue, Y., Uemura, T., Hirai, R., Shimizu, N. und M. Namba, 2001: Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas, *Anticancer Research*, 21: 657-662.

Ohtani, K., DeGregori, J. und J. R. Nevins, 1995: Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 12146-12150.

Ohtsubo, M. und J. M. Roberts, 1993: Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts, *Science*, 259: 1908 - 1912.

Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. und M. Pagano, 1995: Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition, *Mol Cell Biol*, 15: 2612- 2624.

Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.-K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E. und K. Fukasawa, 2000: Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/Cyclin E in centrosome duplication, *Cell*, 103: 127-140.

Okuda, M., 2002: The role of nucleophosmin in centrosome duplication, *Oncogene*, 21: 6170-6174.

Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J. L., Malumbres, M. und M. Barbacid, 2003: Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice, *Nat Genet*, 35: 25-31.

Parisi, T., Beck, A. R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z. und B. Amati, 2003: Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells, *EMBO J*, 22: 4794-4803.

Payton, M., Scully, S., Chung, G. und S. Coats, 2002: Deregulation of cyclin E2 expression and associated kinase activity in primary breast tumors, *Oncogene*, 21: 8529-8534.

Payton, M. und S. Coats, 2002: Cyclin E2, the cycle continues, *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 315-320.

Peng, S.-Y., Chou, S.-P. und H.-C. Hsu, 1998: Association of downregulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma, *J Hepatol*, 29: 281-289.

Perraud, F., Dalemans, W., Gendrault, J.-L., Dreyer, D., Ali-Hadji, D., Faure, T. und A. Pavirani, 1991: Characterization of trans-immortalized hepatic cell lines established from transgenic mice, *Exp Cell Res*, 195: 59-65.

Peter, M. und I. Herskowitz, 1994: Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle, *Cell*, 79: 181-184.

Petrova, T. V., Mäkinen, T., Mäkelä, T., Saarela, J., Virtanen, I., Ferrell, R. E., Finegold, D. N., Kerjaschki, D., Yla-Hertuala, S. und K. Alitalo, 2002: Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor, *EMBO J*, 21: 4593-4599.

Pitot, H. C.: Proto-oncogene activation in multistage murine hepatocarcinogenesis, in: *Mouse liver carcinogenesis: Mechanisms and species comparisons*, Alan R. Liss, Inc., 1990, Seiten 311-324.

Polanowska, J., Fabbrizio, E., Le Cam, L., Trouche, D., Emiliani, S., Herrera, R. und C. Sardet, 2001: The periodic down regulation of the cyclin E gene expression from the exit of mitosis to end of G1 is controlled by a deacetylase-and E2F-associated bipartite repressor element, *Oncogene*, 20: 4115-4127.

Porter, C. P. und K. Keyomarsi, 2000: Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity, *Nucleic Acids Res*, 28: e101.

Porter, D. C., Zhang, N., Danes, C., McGahren, M. J., Harwell, R. M., Faruki, S. und K. Keyomarsi, 2001: Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms, *Mol Cell Biol*, 21: 6254-6269.

Prober, D. A. und B. A. Edgar, 2001: Growth regulation by oncogenes - new insights from model organisms, *Curr Opin Genet Dev*, 11: 19-26.

Pujol, M. J., Jaime, M., Serratosa, J., Jaumot, M., Agell, N. und O. Bachs, 2000: Differential association of p21Cip1 and p27Kip1 with cyclin e/cdk2 during rat liver regeneration, *J Hepat*, 33: 266 - 274.

Ramirez-Solis, R., Davis, A. C. und A. Bradley: Gene targeting in embryonic stem cells , in: Wassarman, P. M. und M. L. DePamphilis (Ed.): *Methods in Enzymology*, Volume 225, Guide to techniques in mouse development, Academic Press, 1993, Seiten 855-878.

Ren, S. und B. J. Rollins, 2004: Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit, *Cell*, 117: 239-251.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und S. I. Reed, 1994: Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system, *Mol Cell Biol*, 14: 1669-1679.

Resnitzky, D. und S. I. Reed, 1995: Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition, *Mol Cell Biol*, 15: 3463-3469.

Richter, J., Wagner, U., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackerman, D., Maurer, R., Alund, D., Knönagel, H., Rist, M., Wilber, K., Anabitarte, M., Hering, F., Hardmeier, T., Schönenberger, A., Flury, R., Jäger, P., Fehr, J. L., Schraml, P. Moch, H., Mihatsch, M. J., Gasser, T., Kallioniemi, O. P. und G. Sauter, 2000: High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer, *Am J Pathol*, 157: 787-794.

Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. und P. Berg, 1977: Labeling desoxynucleic acid to high specific in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J Mol Biol*, 113: 237-251.

Robbinson, M. und M. McKinney, 1992: Transcriptional regulation of neuromodulin, GAP-43 in mouse neuroblastoma clone N1E-115 is evaluated by the RT/PCR method, *Mol Brain Res*, 13: 83-92.

Roberts, G. C. und C. W. J. Smith, 2002: Alternative splicing: combinatorial output from the genome, *Curr Opin Chem Biol*, 6: 375-383.

Roberts, J. M. und C. J. Sherr, 2003: Bared essentials of cdk2 and cyclin E, *Nat Genet*, 35: 9-10.

Rodriguez, C. I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A. F. und S. M. Dymecki, 2000: High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP, *Nature Genet*, 25: 139-140.

Roths, J. B., Foxworth, W. B., McArthur, M. J., Motzgomery, C. A. und A. B. Kier, 1999: Spontaneous and engineered mutant mice as models for experimental and comparative pathology: History, comparison, and developmental technology, *Lab Anim Sci*, 49: 12-34.

- Ruffner, H., Jiang, W., Craig, G., Hunter, T. und I. M. Verma, 1999: BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site, *Mol Cell Biol*, 19: 4843-4854.
- Said, T. K. und D. Medina, 1995: Cell cyclins and cyclin-dependent kinase activities in mouse mammary tumor development, *Carcinogenesis*, 16: 823 - 830.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and H. A. Erlich, 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239: 487-491.
- Sandhu, C. und J. Slingerland, 2000: Deregulation of the cell cycle in cancer, *Cancer Detect Prevent*, 24: 107-118.
- Sandhu, C., Donovan, J., Bhattacharya, N., Stampfer, M., Worland, P. und J. Slingerland, 2000: Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells, *Oncogene*, 19: 5314-5323.
- Sanger, F., Nicklen, S. und A. R. Coulson, 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467.
- Sauer, B. und N. Henderson, 1988: Site-specific recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5166-5170.
- Sauer, B. und N. Henderson, 1989: Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome, *Nucleic Acids Res*, 17: 147-161.
- Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Justin, R. P., Barnett, S. und M. R. Capecchi, 2000: Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 13702-13707.
- Schraml, P., Bucher, C., Bissig, H., Nocito, A., Haas, P., Wilber, K., Seelig, S., Kononen, J., Mihatsch, M. J., Dirnhofer, S. und G. Sauter, 2003: Cyclin E overexpression and amplification in human tumours, *J Pathol*, 200: 375-382.
- Schulman, B. A., Lindstrom, D. L. und E. Harlow, 1998: Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 10453-10458.
- Sewing, A., Rönicke, V., Bürger, C., Funk, M. und R. Müller, 1994: Alternative splicing of human cyclin E, *J Cell Sci*, 107: 581-588.
- Shanahan, F., Seghezzi, W., Parry, D., Mahony, D. und E. Lees, 1999: Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest, *Mol Cell Biol*, 19: 1460-1469.

Sherr, C. J., 1993: Mammalian G1 cyclins, *Cell*, 73: 1059-1065.

Sherr, C. J., 1994: G1 phase progression: Cycling on cue, *Cell*, 79: 551-555.

Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E. und J. J. Sharp, 1997: Genetic variation between 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice, *Nature Genetics*, 16: 19-27.

Singer, J. D., Gurian-West, M., Clurman, B. und J. M. Roberts, 1999: Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells, *Genes and Dev*, 13: 2375-2387.

Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. und D. Rogers, 1988: Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides, *Nature*, 336: 688-690.

Smith, E. J., Leone, G., DeGregori, K., Jakoi, L. und J. R. Nevins, 1996: The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state, *Mol Cell Biol*, 16: 6965-6976.

Spruck, C. H., Won, K.-A. und S. I. Reed, 1999: Deregulated cyclin E induces chromosome instability, *Nature*, 401: 297 - 300.

Starck, D.: Primitiventwicklung der Säugetiere, in: Starck, D.: Embryologie, Georg Thieme Verlag, 3. Auflage, Stuttgart, 1975, Seiten 203-318.

Stärkel, P., Lambotte, L., Sempoux, C., De Saeger, C., Saliez, A., Maiter, D. und Y. Horsmans, 2001: After portal branch ligation in the rat, cellular proliferation is associated with selective induction of c-Ha-ras, p53, cyclin E, and Cdk2, *Gut*, 49: 119-130.

Stenzel, K., 1997: Etablierung von Hepatozytenlinien aus IgEGF-transgenen Mäusen zu vergleichenden Untersuchungen der hepatozellulären Karzinogenese in vivo und in vitro, Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover.

Stern, D. F., Hare, D. L., Cecchini, M. A. und R. A. Weinberg, 1987: Construction of a novel oncogene based on synthetic sequence encoding epidermal growth factor, *Science*, 235: 321-324.

Stighall, M., Berglund, P. und G. Landberg, 2003: Lower Molecular Weight Forms of cyclin E super activators of the cell cycle?, *Cell Cycle*, 2: 458-460.

Takeuchi, T., Nomura, T., Tsuijita, M., Suzuki, M., Fuse, T., Mori, H. und M. Mishina, 2002: Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting, *Biochem Biophys Res Com*, 293: 953-957.

Tarapore, P., Okuda, M. und K. Fukasawa, 2002: A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of cdk2/ cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication, *Cell Cycle*, 1: 75-81.

Taylor, J. M., Illmensee, R. und J. Summers, 1976: Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase, *Biochem Biophys Acta*, 441: 324-330.

Te Riele, H., Maandag, E. R. und A. Berns, 1992: Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 5128-5132.

Thomas, K. R. und M. R. Capecchi, 1987: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell*, 1987: 503-512.

Todaro, G. J. und S. A. Aaronson, 1968: Development of 3T3-like lines from BALB/c mouse-embryo cultures: transformation susceptibility to SV40, *J Cell Physiol*, 72: 141-148.

Tomasz, M., Lipman, R., Chowdry, D., Pawlak, J., Verdine, G. L. und K. Nakanishi, 1987: Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA, *Science*, 6: 1204-1208.

Tönjes, R. R., Löhler, J., O'Sullivan, J. F., Kay, G. F., Schmidt, G. H., Dalemans, W., Pavirani, A. und D. Paul, 1995: Autocrine mitogen IgEGF cooperates with c-myc or with the Hcs locus during hepatocarcinogenesis in transgenic mice, *Oncogene*, 10: 765-768.

Tribble, G., Ahn, Y.-T., Lee, J., Dandekar, T. und M. Jayaram, 2000: DNA recognition, strand specific selectivity and cleavage mode during intergrase family site-specific recombination, *J Biol Chem*, 275: 22255-22267.

Tsuji, T., Miyazaki, M., Fushimi, K., Mihara, K., Inoue, Y., Ohashi, R., Ohtsubo, M., Hamazaki, K., Furusako, S. und M. Namba, 1998: Cyclin E overexpression responsible for growth of human hepatic tumors with p21WAF1/CIP1/SDI1, *Biochem Biophys Res Com*, 242: 317 - 321.

Vasquez, K. M., Marburger, K., Intody, Z. und J. H. Wilson, 2001: Manipulating the mammalian genome by homologous recombination, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 8403-8410.

Vidal, A. und A. Koff, 2000: Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause, *Gene*, 247: 1-15.

Vlach, J., Hennecke, S. und B. Amati, 1997: Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, *EMBO J*, 16: 5334 - 5344.

Voitenleitner, C., Rehfuß, C., Hilmes, M., O'Rear, L., Liao, P.-C., Gage, D., Ott, R., Nasheuer, H.-P. und E. Fanning, 1999: Cell cycle-dependent regulation of human DNA polymerase α -primase activity by phosphorylation, *Mol Cell Biol*, 19: 646-656.

Wade, C. M., Kulbokas, E. J., Kirby, A. W., Zody, M. C., Mullikin, J. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K. und M. J. Daly, 2002: The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome, *Nature*, 420: 574-578.

Wang, X. D., Rosales, J. L., Magliocco, A., Gnanakumar, R. und K.-Y. Lee, 2003: Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain, *Oncogene*, 22: 769-774.

Wei, Y., Jin, J. und J. W. Harper, 2003: The cyclin E/cdk2 substrate and cajal body component p220NPAT activates histone transcription through a novel LisH-like domain, *Mol Cell Biol*, 23: 3669-3680.

Welcker, M., Singer, J., Loeb, K. R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien-West, M., Clurman, B. E. und J. M. Roberts, 2003: Multisite phosphorylation by cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation, *Molecular Cell*, 12: 381-392.

Weng, L., Zhu, C., Xu, J. und W. Du, 2003: Critical role of active repression by E2F and Rb proteins in endoreplication during *Drosophila* development, *EMBO J*, 22: 3865-3875.

West, S. C., 2003: Molecular views of recombination proteins and their control, *Nature Reviews*, 4: 1-11.

Wimmel, A., Lucibello, F. C., Sewing, A., Adolph, S. und R. Müller, 1994: Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E, *Oncogene*, 9: 995 - 997.

Winston, J. T., Coats, S. R., Wang, Y.-Z. und W. J. Pledger, 1996: Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras, *Oncogene*, 12: 127 - 134.

Winston, J. T., Chu, C. und J. W. Harper, 1999: Culprits in the degradation of cyclin E apprehended, *Genes and Dev*, 13: 2751-2757.

Won, K.-A. und S. I. Reed, 1996: Activation of cyclin E/cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E, *EMBO J*, 15: 4282-4193.

Woo, R. A. und R. Y. C. Poon, 2003: Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells, *Cell cycle*, 2: 316-324.

Wüstefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M. P. und C. Trautwein, 2000: Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice, *Hepatology*, 32: 514-522.

Xiangming, C., Natsugoe, S., Takao, S., Hokita, S., Tanabe, G., Baba, M., Kuroshima, K. und T. Aikou, 2000: The cooperative role of p27 with cyclin E in the prognosis of advanced gastric carcinoma, *Cancer*, 89 : 1214-1219.

Ye, X., Zhu, C. und J. W. Harper, 2001: A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1682-1686.

Ye, X., Wei, Y., Nalepa, G. und J. W. Harper, 2003: The cyclin E/cdk2 substrate p220NPAT is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells, *Mol Cell Biol*, 23: 8586-8600.

Yerly-Motta, V., Contassot, E., Pavy, J. J., Tiberghien, P. und P. Herve, 1999: Expression of cyclins and cdks throughout murine carcinogenesis, *Cell Mol Biol*, 45: 1217-1228.

Zariwala, M., Liu, J. und Y. Xiong, 1998: Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of cdk2 and cdk3, is induced by viral oncoproteins, *Oncogene*, 17: 2787-2798.

Zerfass-Thome, K., Schulze, A., Zwerschke, W., Vogt, B., Helin, K., Bartek, J., Henglein, B. und P. Jansen-Dürr, 1997: p27^{KIP1} blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression, *Mol Cell Biol*, 17: 407-415.

Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W. und D. C. Dean, 2000: Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF, *Cell*, 101: 79 - 89.

Zhang, Y., Woodford, N., Xia, X. und A. W. Hamburger, 2003: Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases, *Nucleic Acids Res*, 31: 2168-2177.

Zhou, Q., He, Q. und L.-J. Liang, 2003: Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance, *World J Gastroenterol*, 9: 2450-2454.

Zou , L. und B. Stillman, 2000: Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and cdc7p-Dbf4p kinase, *Mol Cell Biol*, 20: 3086-3096.

9 Anhänge

Anhang 1: Beschreibung der hepatozellulären Karzinome aus transgenen Mäusen

Stamm:	CD2F1	Alter:	9,5 Monate
Tier-Nr.:	35.5	Körpergewicht [g]:	32,8
Genotyp:	AAT/myc	absolutes Lebergewicht [g]:	8,05
Geschlecht:	weiblich	relatives Lebergewicht [%]:	24,5
geb.:	03.11.1998	Bemerkung:	stark tumorös
Tumor- Nr.:	N1	Tumorzvolumen [mm³]:	Tumorgewicht [g]:
Makroskopie: normales, nicht-tumoröses Lebergewebe			
Tumor- Nr.:	2	Tumorzvolumen [mm³]:	5000
		Tumorgewicht [g]:	3,8
Makroskopie: Tumor nimmt gesamten Leberlappen ein; mehrere Vorwölbungen; rot; innen solide; starke oberflächliche Blutgefäßversorgung			
Tumor- Nr.:	3	Tumorzvolumen [mm³]:	400
		Tumorgewicht [g]:	0,23
Makroskopie: runder Tumor; stark vorgewölbt; gelblich; innen solide			
Tumor- Nr.:	4	Tumorzvolumen [mm³]:	250
		Tumorgewicht [g]:	0,28
Makroskopie: runder Tumor; stark vorgewölbt; gelblich; innen solide			
Tumor- Nr.:	5	Tumorzvolumen [mm³]:	75
		Tumorgewicht [g]:	0,12
Makroskopie: runder Tumor; stark vorgewölbt; gelblich; innen solide			
Tumor- Nr.:	6	Tumorzvolumen [mm³]:	1000
		Tumorgewicht [g]:	0,56
Makroskopie: stark vorgewölbt; gelblich-rosa; innen solide mit mehreren Knoten; gut entwickelte oberflächliche Blutgefäßversorgung			
Tumor- Nr.:	7	Tumorzvolumen [mm³]:	1600
		Tumorgewicht [g]:	0,6
Makroskopie: sehr groß, von rötlicher Farbe; starke Blutgefäßversorgung; innen solide			
Tumor- Nr.:	8	Tumorzvolumen [mm³]:	1100
		Tumorgewicht [g]:	0,55
Makroskopie: starke Blutgefäße schnüren drei Knoten unterschiedlicher Farbe und Konsistenz ein; innen solide, rot und gut durchblutet			
Stamm:	CD2F1	Alter:	9 Monate
Tier-Nr.:	36.6	Körpergewicht [g]:	30,6
Genotyp:	AAT/myc	absolutes Lebergewicht [g]:	7,87
Geschlecht:	weiblich	relatives Lebergewicht [%]:	25,6
geb.:	12.11.1998		
Tumor- Nr.:	N9	Tumorzvolumen [mm³]:	Tumorgewicht [g]:
Makroskopie: normales, nicht-tumoröses Lebergewebe			
Tumor- Nr.:	10	Tumorzvolumen [mm³]:	5000
		Tumorgewicht [g]:	3,8
Makroskopie: Tumor nimmt gesamten Leberlappen ein; mehrere Vorwölbungen; rot; innen solide; starke oberflächliche Blutgefäßversorgung			

Tumor- Nr.: 11 Tumolvolumen [mm³]: 400 Tumorgewicht [g]: 0,23

Makroskopie: runder Tumor; stark vorgewölbt; gelblich; innen solide

Tumor- Nr.: 12 Tumolvolumen [mm³]: 250 Tumorgewicht [g]: 0,28

Makroskopie: runder Tumor; stark vorgewölbt; gelblich; innen solide

Tumor- Nr.: 13 Tumolvolumen [mm³]: 75 Tumorgewicht [g]: 0,12

Makroskopie: runder Tumor

Stamm:	CD2F1	Alter:	11 Monate
Tier-Nr.:	27.5	Körpergewicht [g]:	28,6
Genotyp:	EGF +/-	absolutes Lebergewicht [g]:	5.0
Geschlecht:	weiblich	relatives Lebergewicht [%]:	17,5
geb.:	26.09.1997	Bemerkung:	leichte Schwellung des Abdomens

Tumor- Nr.: 14 Tumolvolumen [mm³]: 210 Tumorgewicht [g]: 0,38

Makroskopie: an der Spitze des linken, dorsalen Leberlappens; rundliche Form; mehrere Knoten erkennbar; diese zumeist rötlich vom Leberparenchym abgesetzt; von der Peripherie eindringende Blutgefäße; wenige kleine Nekrose- und Verkalkungsherde zentral im Tumor

Tumor- Nr.: 15 Tumolvolumen [mm³]: 50 Tumorgewicht [g]: 0,18

Makroskopie: an der Spitze des rechten, dorsalen Leberlappens; rundlich; dorsal deutlich vorgewölbt; ventral erkennbar; helles, rosa-weißes Tumorgewebe

Tumor- Nr.: 16 Tumolvolumen [mm³]: 15 Tumorgewicht [g]: 0,08

Makroskopie: zentral im rechten, ventralen Leberlappen; rundlich; nicht vorgewölbt; heller Tumor deutlich gegen Leberparenchym abgesetzt

Tumor- Nr.: 17 Tumolvolumen [mm³]: 720 Tumorgewicht [g]: 1,2

Makroskopie: an der cranialen Spitze des linken dorsalen Leberlappens; größter Tumor in dieser Leber; ovale Form; beidseitig des Leberlappens stark aufgewölbt; innerhalb des Tumors viele rundliche Herde unterschiedlicher Färbung erkennbar; cranialer Teil des Karzinoms rot-dunkelrot; caudaler Teil weißlich-rosa; von der Peripherie starke Blutgefäßversorgung

Tumor- Nr.: 18 Tumolvolumen [mm³]: 150 Tumorgewicht [g]: 0,35

Makroskopie: an der Spitze des linken, ventralen Leberlappens; beidseitig vorgewölbt; rötlich-weißliches Gewebe

Tumor- Nr.: 19 Tumolvolumen [mm³]: 125 Tumorgewicht [g]: 0,22

Makroskopie: im rechten, ventralen Leberlappen an der Aufzweigungsstelle der Leberlappen; rundlich mit dorsaler Vorwölbung; intern einzelne Herde von rötlicher bis weißer Farbe

Tumor- Nr.: 20 Tumolvolumen [mm³]: 50 Tumorgewicht [g]: 0,3

Makroskopie: zentral im rechten, ventralen Leberlappen; nicht vorgewölbt

Tumor- Nr.: 21 Tumolvolumen [mm³]: 15 Tumorgewicht [g]: 0,1

Makroskopie: zentral im rechten, ventralen Leberlappen; nicht vorgewölbt

Stamm:	CD2F1	Alter:	3 Monate
Tier-Nr.:	6.3	Körpergewicht [g]:	33,0
Genotyp:	EGF2B/MYC	abs. Lebergewicht [g]:	8,1
Geschlecht:	weiblich	rel. Lebergewicht [%]:	24,5
geb.:	12.06.1999		
Tumor- Nr.: 22	Tumorzvolumen [mm³]: 640	Tumorgewicht [g]:	0,3
Makroskopie: randständig und beidseitig vorgewölbt; weiß-gelblich; deutlich oberflächlich vaskularisiert; innen solide			
Tumor- Nr.: 23	Tumorzvolumen [mm³]: 1000	Tumorgewicht [g]:	0,65
Makroskopie: wie Tumor 22			
Tumor- Nr.: 24	Tumorzvolumen [mm³]: 1500	Tumorgewicht [g]:	1,2
Makroskopie: ventral vorgewölbter Tumor, innen solide, rot bis gelb; mit sehr guter oberflächlicher Blutgefäßversorgung			
Tumor- Nr.: 25	Tumorzvolumen [mm³]: 340	Tumorgewicht [g]:	0,26
Makroskopie: kugeliger Tumor, innen solide, opak-weiß; ohne oberflächliche Blutgefäßversorgung			
Tumor- Nr.: 26	Tumorzvolumen [mm³]: 700	Tumorgewicht [g]:	0,6
Makroskopie: randständig und beidseitig vorgewölbt; weiß-gelblich; deutlich oberflächlich vaskularisiert; innen solide			
Tumor- Nr.: 27	Tumorzvolumen [mm³]: 900	Tumorgewicht [g]:	0,75
Makroskopie: vorgewölbt; rosa-rot; geringe Blutgefäßversorgung; innen solide; Knoten im Knoten			

Anhang 2: Genomische Cyclin E1-Sequenz mit 5'- und 3'-flankierenden Bereichen

Die Sequenz des murinen Cyclin E1-Gen sowie der 3'- und 5'- gelegenen Sequenzabschnitte wurde aus NCBI ACCESSION: NT 081350 entnommen (vergleiche Mouse Genome Sequencing Consortium ACCESSION: CAAA01053590).

```

ACATTCCACT TGGGCGGCCC ATGCCGCTCC TCCCGGCCCC GCACGCTCAG AATCCTTCAG 60
GCGCTCGCGC CAAGATTCTC CCGCGTCAGC GAGCCCGCCC CGCAGCCGCG CGCGCCAGAC 120
GACTCTCCCG CGTCCCGCCC CGCGCAGGCC CCGCCTACCA CGTCCGCACC CCGCCCCCGG 180
CGCGCAGGCC CTGACATCTA GCCCCACCCC TTTAGTGCAT GCCACGCCCC TAAAAGAACA 240
CGCCCCCGGG GAGGCCACGC CCCACCAGA GCTCCTCGCT GGTCCGCGCG GCGACGGGGC 300
GGGCCCCGGG CTTGCGGCGG CCGCTGAGGG GCTCGCAGCC CTCGGGGCGG GGCGCGAGGG 360 NotI
CGGGACGGGG CCGGTGCCGC GCGCTGGGAT TTTTAAATGT CCCGCTCGAA GCCGGGCGCA 420
GGAGCAGCCG GCTCGACAGC CAGCGCGGTG TAGGGGGCAG GCGCGGATCC CGCCAGCGCC 480 BamHI
GCGCGCTCGG CCGCCGCCTC CCGCCTCCTG CTTCCCGCTC GCCGTCGGCC TCCTGCCCCG 540 XhoI
TCGAGCGCGC CTGCCTGCGG CGGACACAGC TTTCGGTACG GGCTGCCTGG ACTCCCGGGA 600 Exon 1
CTCCCGGGAC TCCCACGACT CCCAGGCGTC CGGACCGGGT CCGACCAGAC CGGACCGGGC 660
CCGGGTGGGG GTGGGGCGAG GCCGGGTCAC CCGTCCCCTT GAGGTATCAG CTCGGGGTGC 720
CCCGGCCGGG GTGGCTGTGA GAGACGGGTC AGGGGTAGGT GTAGAAAGGG AACTGAGGC 780
AGCCCCGGCC CCGAGGACGG TGATGGAGCG GGGGTCCTC TTGAAGGGCG GCTGGGCCTC 840
CATCCCCAAC CTCAGGTTTC GACCCAGGGT CGCAGGCTGC TGGCGGCGCC TCGGGGTGAC 900
AAGCCACCCG GGCCCATCGG CCATTTTCCC GGCCGGCCTC CGGGCCCAGG AGGCTCCCCG 960 FseI
CGCCGCGGCC CGCGCGGGAG GGGGGAGGGG TGCCCGGGAC GAACTGGAAG ACTCAGGTCC 1020
CCTCTGCGGG CCGTGCTCAC CACGATGCTT GCTTGTGTTC CTCCAGGTC TGAGTTCCAA 1080 Exon 2
GCCCAAGTCC TGAGCCATGC CAAGGGAGAG GTGAGTGCC TCCCTGCTGC GGGAGGGTAA 1140
GGGTGAGTAG CCGTGGGGGA GGGGCGGCCT GAGT'TTTTGG GGAGCAGCAC CCCATGACAC 1200
CATGCCCTTG CAGAGACTCG ACGGACCACA GCAACATGAA AGAAGAAGGT GGCTCCGACC 1260 Exon 3
TTTCAGTCCG CTCCAGAAAA AGGAAGGCAA ATGTGGCCGT GGTGAGTACA AAGGATACAG 1320
GTTGGGAAGG GGACAGCCCA CCCCCCTTC CATCTTACCT GGGTACCAAA TTTGGTTCTT 1380
CTTACCTACT AGTGAAAAGA ATTAGTTGAG AGAGAGGTTT CCTTTAGTTG AATGTCGTTT 1440
ATGACCTAAC AAACATTTCC CCCTTTTCTT CTTGTGTTTT TTGTCTTTGG GTCGCACCAT 1500
GTGGACCCAT GGTGGACCGG GATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTAGT TTTTGCAAGA 1560
CCCAGATGAA GAAATTGCCA AGATTGACAA GACTGTGAAA AGCGAGGATA GCAGTCAGGT 1620 Exon 4
AGGTCTGCTG CCTACAGGGT ATTCTGCCTC CTGGGTTCCA GGT'TTTCTTT CTTCCTAACT 1680
TCCCAAAACA GAGCTGCAGG CCACATGGCT GAACCTCTGA AGCTTGTC TGTGGCCTGG 1740 HindIII
TCTCAGTTGG GCCTGGGGTT GTGGGAGGGG TTTGTGTTTC CTGAATGGCA CCTTTAAGGT 1800
TACAGGTAAT GATACCTGGA GGAACCAGAG TGAGTGATA ATTTGGTCCT TTCTAAGCCC 1860
AGGGGGAAAC TGAGTCTTAT TAGAAGGTAA CCCAGAGTCC TTTGCAAACC CAGCAGAGCT 1920
GGGCCTGCAG TCTTACTGCG GAAGGCTAGT TGGGGGATAG GACTCCCAAC TCTTCTCCC 1980
TTGTCCATTC TTGTGACTTT TCCTAATCCC AGCAGTAGAG AAGCAAGGGC AGGCCCTCTG 2040
AGTTCCACGC CAGCCCAGAC CGTAGAGTGA GACCCTGTAG CAAAACTAA ACTTTTCTCC 2100
TATGCAACCC AGAATGTTCC ACCATCAGCT CACTACATTG ATCACTGCTG TCTGGACCTT 2160
ACGTGGCCTC AGCAAGGATC TGTAAATGAC TGTGTCTCAA CCAGTATTTT ATTGGCTGCT 2220
CCATTTCTTC TGTCCCTCCT AATGTGGTGT TTGCCAGATC TTTCTAATGC AGCATGGTAT 2280
CATAATATGA GAAGATCCTT GCATGCAGAG AGAGCTTCTA TTATCTCTTT GCCTCCAGCA 2340
ATGGCTGGGG ACTATAGTTA TGGCTGCAGT GGGGGAGCGG CCTATCTCCA AAGTGGCTGG 2400
TGACACCTTT GGCCTTCATC AAAGATAAAG CTGAGCAAGA CCAGTATTTT GTTGGCCTCA 2460

```

TCTCTCTTCT	CCCAAAGGCT	AGTGGTGACT	GTAGAGCAGG	GAGAGACAAA	TGGTTGTGAG	2520	
GAATGTCTTC	TGAGCAATGA	TGTTCTGCCA	GCTAGGGCTG	CAGCAATGTG	CAGTTCTCGG	2580	
CAGGACCCCA	GTAGACATTT	TGTTGTTGTT	GTTTTTTTTTAA	AAAGGGGGGG	GTCAGTTTTT	2640	
TTCCTGTTTA	AAAAAAAAAA	AGTAGCCCCCT	ACAGAAGAAA	AATGCATCCC	ATATTTTTTTT	2700	
CTCCCATTTT	CTTCAGCAAG	TTGTTTTAGT	TGTCATTATT	GAATTGAGTT	CAGCCCAGTG	2760	
TCTCAACTTT	GAGCCAGTGA	GAGTCCTCAT	ATTAAATTCA	ATGATACTGA	AAGCCCACAA	2820	
AGATTTTTGA	TTCTTATCTT	CAGCTACTAT	TTTTGGTTTTT	GAAAAAGGGT	CCCTAAATGT	2880	
AACTCAGGCT	GACCTTGAAC	TCAATGATCC	CTTCCCCCAG	CCTCCAGAGT	GCTGGGCTAG	2940	
AAGCACGCAC	ACTACCACCA	CTTCAGTTGC	TCTGAATGAC	TGCATGTCCA	TTCTCCTGTT	3000	
AGCCTTCTTC	ACAAACCTTT	TCATTTTATT	GTATTTGGTT	TTTTGTTTTTT	GAGATGGCTC	3060	
CCACTGTAGT	AGCCTTGGGT	GACCTGGAGC	TCACTATGTA	CCAGGCTGGT	CTCAAACCTCA	3120	
AAAAGATTGC	CTGAGCACTT	CTGAGTGCTG	AGATTAAATG	CAGGAGTCAT	CATATCCATC	3180	
AAGACATAAC	TTTTTTTCAGA	ACGCTAGTCA	GCCATTTTTTC	TACTTGTTTTT	GCATAAGGAA	3240	
GAAGTATGGT	ATGAGGATAA	AAGGTGGTAA	GCCACAGTTG	CAGTTGATCT	CAAAGTCAGG	3300	
CTGATCTGGC	ACCGTATAAA	ACTTCATATA	CACTCAAAAC	CAGACTTAAT	TATTCTGCCT	3360	
TATCCACTGG	CTTCTTAAAA	AGCCAACTTT	GAAGCCCTTT	TGTCTGTTGA	AGGCACACTT	3420	
AATTTGTCTA	TGAAGTGCAG	GTTGGAAACT	ACTAAATTTA	TCTCTAAAGG	CCTGCTCCCA	3480	
GATGTGCCAG	CCACCTGGCT	GTGGAGGGCG	ACACCTAGCT	TGTACCTTCA	AAAGAACTTG	3540	
GTCTTGATTG	AAGTATGGTG	GTAATTGTGA	ACCTTTTGAG	TCAGGGCCGG	TGATGCTATA	3600	
CCAAACATAC	AAAGCCAGAG	CTGAAAGGAA	GCTGCCTTTC	TCGCACAGCT	GGCAGGCGCT	3660	
GTTGTGGGTA	ATTTGCATGC	TCAATTCCTT	CTACATTGAG	CAGAGAGAAAG	CTTCTGCAG	3720	HindIII
CACTGGTTGG	AAATCAGGGG	TTCTGTGAA	AATGGTCTGG	GTGCCGCAAG	CCACCCAGGT	3780	
TCAATTCAGG	AAAACATCCC	CAGGCATATC	CGTTTTGTTT	AATGGTCTCT	GCTTAAAATA	3840	
AGATAGCTGT	TGGTGCTAGG	TACAGTTATG	AGGTGAGGCA	GGAGGATCAT	GAGTTAGAAA	3900	
CCATTGAACT	GCATAAGCAA	GACTGGAAC	CAGAAATCCG	CCTACCTCTG	CCTCCCAAGT	3960	
GCTGAGTGAG	ATTAAAGTTG	TGTGCCACCA	CTACCCAGCT	AATTTATTTT	TAAGTATGAA	4020	
TGCTTTGCCA	ATCTGTATGT	CTGTGCGATG	TTTGTACCTG	GTGCTTGCAG	AAGCTAGAGA	4080	
GGGTGTTGAA	TCTTCTGATT	ACTTCTACTA	GAGTAACGTG	GGCTATTGAA	TAGGATATGA	4140	
AATCACTTCT	TTGGACTCAT	TAGTTTGATC	TGTGATCACA	ACTTAGTGCT	AATGAGGTAG	4200	
CAATTTGTCT	CGCTTTGAGT	TAGGGGAAAC	CAAATGAAGC	TGTTCCATTT	ATATGACTAC	4260	
TCTTTTTTTG	TAATATAAGT	TACTTTTTTTT	TTTAAGGTGT	ATTTATTTAC	ATGAGTACAC	4320	
TGTAGCTGTC	TTCAGACACA	CCAGAAGAGG	GCATCAGATC	CTATTACCGA	TGGTTGTGAA	4380	
CCACCATGTG	GTTGCTGGGA	ATTGAACTCA	GGACCTCTAG	AAGAGCAAAC	AGTTAGTGCT	4440	
CTTAAGTGCT	GAGCCATCTT	TCCAGCCCCA	TAAGTTACTT	TTTGTGTCCA	GTTGGCCACC	4500	
TGAGTATTTT	AGTTGATGTC	CCTGTTTCTG	AAGTTAGTTA	CAGAAGTGTC	ATGGAGTCTT	4560	
TGAGGCATGC	CTTTGGCTTT	TGTGTCTTCA	TACTGCCTCC	ATTTTAGCCG	AGGCCAGCAT	4620	
ATCAAGCCCA	GTAATCTCCC	AGTCCATGAA	TGGACAAGTT	GCTGGTTTGC	CTCCAAACAA	4680	
TTGGCATGTG	TTCTATTGGC	AGCCCTGGGA	TGATAATTCA	GCATGCGTGG	ACCCCTGCTC	4740	Exon 5
TTTCATCCCC	ACCCCTAACA	AAGAAGAGGA	CAATGAGCTT	GAATACCCCA	GGACTGCATT	4800	
TCAGCCTCGG	AAAATCAGAC	CACCCAGAGC	CTCCCCACTT	CCCGTCTTGA	AGTAGGTGTT	4860	
GACTTTGACC	CATGGCTTCT	CAGTGTCAAT	GGTCTTTCTG	GTCTACATTA	CTGTGGGTGC	4920	
AGACTGACAT	CTATCTATCT	GAGTTTTTCA	TGTTTCTTGT	TCTTTCTTTT	TACAGTTGGG	4980	
GCAATAGAGA	AGAGGTTTGG	AGGATCATGT	TAAACAAAGA	AAAGACTTAC	CTGAGAGATG	5040	Exon 6
AGCACTTTCT	GCAGCGTCAT	CCTCTCCTGC	AGGCGAGGAT	GAGAGCAGTT	CTTCTGGATT	5100	
GGCTAATGGA	GGTGAGCTTG	GAGGTTCCGG	CTGCTGGGGC	ATCACCCTTG	TTACCTTTCT	5160	
CTGTGCTGCT	GCAGTCTCTG	TGTGCTCTCT	AAACTGTTGA	AGTTTCTGAA	ATAATCTTGT	5220	
CCCTTAGACA	TATTAAAGTT	GGCATTTTCAT	TGTTTTTCCCT	ATCTAAGTGT	GAACAGTTAC	5280	

AAAGTTTGTT	TTTCTAATAA	GTTATTAATT	ACAAATTAAT	GTCTACATAT	ATTTATATAT	5340	
GCTAAATTGT	TTTAAAGATG	TCTACTGGAG	GGCTGGAGAG	ATGGCTCAGC	AGTTAAGAGT	5400	
ACTGGCTGCT	CTTCCAGAGG	TCCTGAGTTC	AAATCCCAGC	AACCACATGG	TGGCTCACAA	5460	
CCATCCATAA	TGAGATCTGA	TGCCATCTTC	TGGTGTCTGA	AGACAGCTAC	AGTGTACTTA	5520	
CATATAATAA	TAAATCTTAA	AAAAAAAAGC	TGTCTACTGG	AATGCACATA	CTAGCTGTGC	5580	
AGCGGTCACT	ATCATTTAATT	ATAGGCATAT	ATGAACAGGT	TATGTGCAGC	AGTCAGATCT	5640	
CAGATGTGCT	TATTTGAATT	<u>CCCGGGATCC</u>	ATTCTTTACC	CCCCAGAAGT	ATTTCTTAAT	5700	EcoRI/
AGACTGTCTT	GTTCTAATCA	CATTGGGAAT	CCACTTCCCT	AGTTCTGTGC	AGTGGTTAAT	5760	BamHI
CAATGAGCAA	GCACATGAGG	CTGGAGTAGT	CTGCCCTGCAT	AGTCTAGGCC	TGTGGCTCCA	5820	
TTCCAGACAG	CTCAAACAAA	TAAAAGAACC	CTCCATATTG	CAGATTTTTT	AAAAGTATGAC	5880	
AGATTAAC TA	GCTAATCACT	AACTTTTTTA	AAATGAAATT	TCAAGGCTGG	GCCCAGCTGT	5940	
GAGTAGTCTG	ATGGTCTAGC	ATGCATGACA	CCCTAGGTTT	AATCCTCAGT	AGTACCAAAA	6000	
GAAAGTGAAA	TTTGATGAGT	GGTGCACCTC	TTGCTGGGGG	TAAACGTTGA	GTGACTTGTA	6060	
GTGCTTGGAT	TCAAGGGAAC	TTCCGGGGTA	CTTATAGTGA	GGAAGAAATG	GCATTTTCTG	6120	
CTGAGAAGTG	GAAGAATCAT	GTTGGCAGGT	TTACCTGTAT	CCCTACTTTA	TATGATATGC	6180	
AGCCTGTTGG	GACCGAACCT	AGAATCATGC	TCTGCATTCT	CTGCTGACTT	GTCGCTTCAG	6240	
GGGCCTGGCT	CAGACAAATT	GCTTACATTT	TGAGTCTGTT	TTATTTTAGA	TAGGCTCTCA	6300	
TGTAGCCCAG	GCTGACCTTG	AACCTGCTAT	GTAGTTAGAG	GTAATATTAA	ACTTCTACCT	6360	
CCTCCTCCCA	AGTAGTGGGA	TTATAAATAT	ATACCACCAC	AAGTGGGTCT	CTCTTTTCTT	6420	
TTTAAAAAAA	AGATTTTATAT	GTATGTCTGT	GTGCCACTGT	GTTTATATAC	TCACAGAGGT	6480	
CCCAAGAGGA	CGTCATCTAG	<u>AATTACAGGC</u>	AGCTGTGAGC	CCATCTGTGT	GTGCTGGGAA	6540	XbaI
CCGAAC TCAG	GTCTAGAGA	GCAGCACGTG	CCCCTGAGC	TGTTTGTCCA	GCTCCAGTCT	6600	
GCTTGCTTGT	CTCTAGCATC	TTCAGGAAGT	AGGTTGCAGA	GTTGTACAGA	TTAGACATAC	6660	
TGTATAAGCC	AGGTGTTATG	GCACAGCCTG	TTGACTACAT	CCTCACTACT	GCAGAAAAGAA	6720	
AGAAAAGCTG	CTGACAGTGC	TGGTGGACAC	<u>TCGAGGAGGC</u>	AGAGGCAGGT	GGAGCTCTGA	6780	XhoI
GGTCAAGGCC	AGCCTGGGCT	ACAGAACAAG	TTCCATTTCT	CGCCAGGGCT	ACACAGTGAG	6840	
ACCCTATTTT	AAAAAGAAAA	TGTAAC TGGT	ATTGTT CAGC	AGTGAAGACT	ATACCAGTTC	6900	
TTTTTCTGAG	TCACGGTGAA	ACCTGTGAAG	GGGGTTGCAT	TCTTAGAACT	GTAGACTTTG	6960	
TGGAGTGGTC	TCTATAAAAG	TGCTACTTTG	GTCAGACCTA	GCCTGGCTGA	TTTGCTCTTG	7020	
CTGTTTGTGT	AAGTCATAGT	GTGCTCAGTT	CCTGGGTCTC	ACTGGGCTGT	GCTTAGGAGG	7080	
AGTAGGGTGA	CAGCCTTGCA	TAAAAGCAGT	TAGCTTTCTT	ACTGTGTCAA	AAGTCAGGCA	7140	
AGTTCGCTTG	TGCTGCCCCT	CAGGAGCCTT	TTCTAACATG	GAATCCTTTT	CCCAGGTGTG	7200	
CGAAGTCTAT	AAGCTCCACA	GAGAGACGTT	CTACTTGGCA	CAGGACTTCT	TTGATCGTTA	7260	Exon 7
CATGGCATCA	CAACATAATA	TCATAAAAAC	ACTTTTACAG	CTTATTGGGA	TTTCAGCCTT	7320	
ATTTATTGCT	TCAAACTTG	AGGTAAAAAA	AAACAAAAAC	AACAACAACA	ACAAAACCTC	7380	
CCTAACATTC	TTTGTGTGAT	AAGCATTATT	TCTTAAATTC	TGCCCCATAG	AACAAC TGTC	7440	
ATATGCACCT	TGAATTC TCT	TAAC TCTGAC	GCTTCTAAGT	TAAGGTAGAC	AGTGT CAGGT	7500	EcoRI
GGAGGCGGGT	AAGGAACAAG	GCCATAGATC	ATTTAGTTTA	GTAGCTACTT	TAACCATAAT	7560	
TGACCTTGGG	ACTGAAGAGA	TTGAAATTGT	GGCATAGTGG	TTTCCCACTT	<u>GGGATCC</u> TAA	7620	BamHI
CACTTAGACA	GCTAAGGTAG	AATGGGCAGT	TTGAGGCC TG	CATGCCCTCA	AAATAATATA	7680	
AAAAGGGTTG	TCGTGGGGTT	CTTTATAGAC	TATAGGGTGA	ATGAAGAAGT	CTAAGCAGTT	7740	
TATCCATGAG	TCTTTTTTGAG	ACAGAATCTC	TGTAGCTCTA	GCTTGCTTGG	ATCCAGCAGC	7800	BamHI
CTCTGGAGTT	GTGACATTAA	AGGCCACCAC	AGCCAGCTAG	CTTTACTTCT	TATAGCTAGC	7860	
ATGCTTTCAG	TTGCTGAAGT	GAGCCAGTGT	TGAGCCATTG	ATTGTATCCT	CTTCCACGT	7920	
CAGCATACTA	GAGCCATTTT	GGATGCATGT	CCTAATCTGA	AAGTGCTAGG	AACGGTTTCT	7980	
TCTAATAGCA	TCTTCC TTTCT	GTTCCCTTTT	AGGAAATCTA	CCCTCCAAAG	TTGCACCACT	8040	
TTGCTTATGT	TACAGATGGC	GCTTGCTCCG	GGGATGAAAT	TCTTACCATG	GAATTGATGA	8100	Exon 8

TGATGAAGGC	AGGTTACACA	TTAATATCGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	8160	
GACAGAGAGA	CAGAGAGAGA	CTGTCTTTCC	CTTGCAAGGT	GTGGTGTGCC	CACCACCACC	8220	
GTGGGTCTTA	TCCAGTTAGC	CATGTGGCAG	GGACTATGGC	TGAGCTTTTC	ACAACTGTCA	8280	
CTTCTTTTCT	TTAGGCCCTT	AAGTGGCGTC	TAAGCCCTCT	GACCATTGTG	TCCTGGCTGA	8340	
ATGTCTATGT	CCAAGTGGCC	TATGTCAACG	ACACGGGTGA	GGTGTGATG	CCTCAGTACC	8400	Exon 9
CACAGCAGGT	CTTCGTGCAG	ATCGCAGAGG	TATGTGGACC	TTCTGCTTGC	CCACTGTGTG	8460	XbaI/
TTTGTGTGGC	ACACCACAGC	TCAGGGGCTT	CTAGAAGCTT	CATGTGGCAT	CTTGCTTAG	8520	HindIII
TGCTCCTGTC	TTCCCTTAGCT	TCTAGACCTG	TGCGTCCTGG	ATGTTGGCTG	CTTAGAATTT	8580	XbaI
CCTTATGGTG	TCCTCGCTGC	TTCTGCTTTG	TATCATTTCT	CCTCACTGGA	GTTGATGCAG	8640	Exon 10
AAGGTCTCAG	GTATGTTGGG	CTTTCCTGTG	AGTTCACAGA	CAAGGTGTCT	TCAAGGTACA	8700	
AGCCAGCTAT	CAGCTGCGGA	CTGAGCCTCT	GACTTCTTTA	CTGGCAGGTT	ATCAGTGGTG	8760	
CGACATAGAG	AAGTGTGTCA	AATGGATGGT	TCCGTTTCGCC	ATGGTTATCC	GGGAGATGGG	8820	
AAGTTCCAAG	CTCAAGCACT	TCCGGGGAGT	CCCCATGGAA	GACTCCCA	ACATCCAGAC	8880	Exon 11
CCACACCAAC	AGCTTGGATT	TGCTGGTCA	TAATCTCCTT	GCTCCCTCCC	ATCAGACAAG	8940	
TACTTAACCA	ACTCTGCCTA	AGGAAAAGCC	AGTTCTAACT	CCATTAAGAA	TGTTTCTAGT	9000	
CCATAGAGTC	TGTGTCTCAG	TATGCGAATA	CTATAGACAT	TAGGTGAGAG	GGGGTGTGTT	9060	
ACTGAGACCA	GTTCTTACTA	GATATAGCCC	AGGCTGACCT	TGAACTCAGA	AGTCTGACTC	9120	
CCCTCAAGTG	GTAGGATTTG	CCACCAAGCC	TAACATAAT	TTTTGCTATT	TCTCCCTCTT	9180	
GCCTCCATAT	TAAAAACATA	CAGCAAGAAA	AACGACACTT	TGTTTAACTT	TGACAACTTT	9240	
CCCTCTTATT	CTTATGTAGG	ACAAAGCCCA	AGCAAAGAAA	GCCATATTGT	CAGAACAGAA	9300	
TAGGATTTCT	CCTCCTCCGA	GTGTGGTCC	GACACCCCA	CCCAGCAGTA	AGAAGCAGAG	9360	
CAGCGAGCAG	GAGACAGAAT	GACCAAACCT	GCCATTGCCT	CCAAAGACAG	TGGTGTGGAA	9420	
GCAGCTGCCT	GGAGCTCCCT	GTGCTGCCCT	GGAGGTCAGG	AGCCCCTGCA	GATGCTGTGC	9480	
TCTATGGAGA	GGTGCATCTC	TTCCGGAGCA	GCAGGGGTCT	GCAAGATGCC	TTGGATGGAA	9540	
GTGCTTTTAT	TGAATGCTAG	GTGTTTAAAC	TATAGGGTCA	AGTACACCAG	CCACCTCCAG	9600	Exon 12
AACACCACTG	AGTGCTCCAG	AAGCTGCTAA	GGAGGGTGCT	ACTTGACCCA	CTGGACTCTT	9660	
CACACAGATG	ACACAAGCTT	GAAGTTAAGG	AGGCCACGCC	ATGGCGGTTG	CTGGCCTCTG	9720	HindIII
CTCGGTGTG	GTAGGTTGCT	GTTGATAGGC	TGTGACCAGT	GGTTGTGAGC	AAGTGTGGGA	9780	
TGCAGAGCCC	ACAGCCTGGC	CTAGGCTGCC	CTTCTCCACT	GTCAGCCAAC	AGCATGTCCT	9840	
GCCTTCATGA	ACTCTTATTT	TGTAAGTGCT	GCTATGTCTA	TCAATTTTAA	ATAAAGATAA	9900	
TACTATCTTT	GAAGCAGCTG	TTCTTAACTC	TGTCTAGTAT	CAGAACTAG	GAGTTGCCTT	9960	
TTAGAGTTGG	TCTACCAAGT	TCTCTTGTTT	TTTTTTCCGA	GACAGGGTTT	CTCTGTGTAG	10020	
CCCTGGCTGT	CCTGGAACCT	ACTCTGTAGA	CCAGGCTGGC	CTCAAACTCA	GAAATCCGCC	10080	
TGCCTCTGCC	TCCTAAGTGC	TGGGATTAAA	GGCATGCGCC	ACCACTGCCT	GGCCAGTTTC	10140	
CTTATTCTTG	AGACAGTCTC	ACAATGCAAC	CCAGGCTGGC	CTAGAGCTTG	CTATATAGCC	10200	
TGGGCTTCCA	TGAGGCTCTC	ACCCACAATG	CCCTACACAG	GCAGCAGTTC	ACACTGTAAT	10260	
TGTCAGCTGT	CTCGTGGAGG	CATTCCACAC	CCAGGGAGTT	TCACTCGTGT	CATCTGTCCCT	10320	
CTCCAGAGTA	TTACAGGTCA	TAGAGCTGTA	ATGCATGGTC	TTCAACCCTTA	CCCAAATATG	10380	
AAGGATATAA	GACATTTTGT	TTAAACAATT	TAACATAGTG	GCCTCAGACT	ACCTCTAAGA	10440	
GGAAAATGAA	CCTGGGCACA	TTGGTGCACA	CCTTGCCCTCA	GCTCCTGGGA	AAATCCAAAAG	10500	
TTCTAGGCTA	TGGCCAGGCC	ACTTAGGAAT	GCCCTGTCTC	AAGACAAGTG	AATGGGAGTG	10560	
TCACGCAGAG	TTGAATGACA	TAGTTAAGTG	AACGTCAGAA	CATTTACTGC	AGATTATCTC	10620	
CTGATGGGCT	ATGCAATCAC	TGGGCCCCGC	TGCTGGCCAC	TGCATTTGAA	ACCTCGTATG	10680	
TACACTTGCA	TCACCTCTGT	TGGTACTATT	TCACTTTAAAC	AATGCTTCAG	TGTGTGTGTG	10740	
TGCACACGCG	GGGCAAGATG	ACTGAGCAAC	TAAAAGGCAC	TTACTTTCAA	CTTCTTATTT	10800	
GAAGTTGGTT	TTCAAGAAATC	TATAAAACAG	AAGGTAGCCA	TTTATAGATAT	ATATTGTATT	10860	
TATGCAAAGT	TGGAGGTATT	CTATTCTTTT	ACTTTGCTTT	TCTGGCTCTG	GAAGCTTTAA	10920	HindIII

GTCTTCCTAG	TAAGTGTATT	AGAAACCTAG	CTGGAGAGAT	GTCTTAGTGG	TTAACAGCAC	10980	
TGGCTGCTCT	TCCAGGTTTG	ATTCCCAAGC	TCTTAACCTC	TGTAACTCGT	TTCAGGAGAT	11040	
CTAGTGCCCT	TTCTGGCTTC	CTTCAGTATT	GCATACATGT	GGTACACAGG	CATACATGCA	11100	
AGGCAAAACA	TTCATACAGA	AAAAACTCTA	AACAAATCTA	TTTGAGTAAT	GGCATTACTC	11160	
AACACTTTTG	TTTTTCAAGA	CAGTTTGTGT	AACAGCCCTA	GTTATCTTGG	GATTTGCTTT	11220	
GTAGACCAGG	ACCAGGCTGG	CCTTGAACCT	AGACCCACCT	GCCTCTGCCT	CCTGGATGCT	11280	
GGGATTAAAG	GCGTTCGCCA	CTACACCCAG	TTAACTCATT	ATTTGTAAAGT	CCCAAAACAAA	11340	
CACTCTTAAA	AAGCAGTGGC	TACCAGGCAT	GGGGACCCAC	ATCTAATCCT	AGCACTCAGA	11400	
ATGCTGAGAC	AGAAGAGTCC	AAGGGTAGCC	TGGGCTGTAT	TGTAAGACTA	TACACACACA	11460	
CATGCCAGTA	ATGTGTGTGA	TTTGTTTGAT	ACAGAGTCTC	CTCACTGTGT	AACCCACACT	11520	
GGCATCAATC	ATGTTTAAAG	CTCTTCAGTG	TTGGAATTGT	AGGTGTGCAC	CACCATGCCT	11580	
AGCATTAAGT	GCTAGTATTG	CCACAGCAAA	TCCATCATTT	GTGCTAACAA	GACAGTTCTT	11640	
CATGAGTGAA	TAAAACCTTT	AGTAATTGGT	AATTTCCATG	GCTCCATCAT	AAGACTAAGG	11700	
GAATCACTAG	TGAGACAAGT	CCCCCTATC	ATCTGGTGAC	AATTTAGTGG	CTTATGTGGC	11760	SpeI
CTCTGGCTTG	GCTCTGTAGA	CCTGATTGAA	ATGTTTTTCC	CTATCTACTA	TTGAACAGCT	11820	
GAGGCCAGGT	GATCAGGGAA	TCACTGAGGT	GAGGTGGCCA	GAAGAATCAA	AAGTAGAGAT	11880	
AGCATGGGAC	TACATCTGGC	ATGGGGATAC	TGCAGCTTAT	TGGTCCAGCA	CCAGTCTTCT	11940	
CCCAGCTCAG	TTTACGAGTG	TGTCACCTCT	CTGAGCACTG	CCTGAAACTG	GTCTGTAGGT	12000	
GTTGGCACGG	ACAGCTTTCC	CATGCTATCT	TCCCCAGATG	GGATTCTGGG	AGCTTAGTGT	12060	
CTTACAGAAG	TCATTTTATA	CCAAGTGGAT	GGATAAATGA	GTGATACTAA	CTAAGGTCAT	12120	
GCGGACTGTT	TCTGAGGCAG	ATAAGTGTGC	TGAGAGAGCA	CCCTCTAAGA	CGTGAACACA	12180	
GTGCCTGACC	CATCTCCTAA	CTCAGCTGCA	GACAAGACGG	GAGGATACTC	GGACAAAAGT	12240	
AGGTCGGAGC	TCAGAGCAGG	GATAGGAGGG	AAATCAGATC	TGATAATGTC	TCGTCTTATT	12300	
TATCCAACCG	TGCATTTTCC	TACCACATGT	TCAGCGGTTT	AAAATTCAAA	TCACATTTAT	12360	
ACCTTGGACA	TTGTTAGAAG	ACTATTTTTA	TCCCTGCTGT	AATCATCTAA	TTTGCTGATT	12420	
ACAGGTCTCA	AATTGCCACA	GAGAACTCAA	TTTTTTGAAAG	AATTGTCCCTA	TTTGATCAAA	12480	
TATGTTATTC	AAGCAATGCA	GTCATTTGTT	CCACAAGGTT	ACCTACTAGG	CAGAGTTAAC	12540	
CAGGAGTAAC	AGCATTAGAA	GCCCACACTT	AAAACCTAAG	ATTAGCTAAT	CTGCCTGCGA	12600	
CAATAGAGTC	CTAAATATAA	TTTGCTGCAG	ACACTCAGTT	CCTGCACTGA	CAGACAATTG	12660	
CATTTTCTAT	TCAATGAGCA	TAGATTTTTT	TTTTCCCCCT	ACCTTGTCCT	AATTCCGAAT	12720	
TTAACTCCAG	AAAACCTCTA	TGTGCTCAGT	TTCACTTGCT	TACCTGGTAC	TGTTTCCAAG	12780	
GAGCCTCGGA	TGGGGAGGGC	AGTGCTGTCT	CTTATTAAAT	AAACAACAAT	GTTAAGTCAT	12840	
TTTTCTCATC	AGTCCCAATT	CTAAAAAGTA	TAGCATCAGA	CTGGCCCTGG	AGATTCAAGT	12900	
CTAAAGCTGG	CTTTTCCACT	TGAATCAATG	CAGTACCTTC	CAGGGGGCGG	GGGATGGGGG	12960	
TGGGGGCTCT	TCTGAATGCT	GGGCATCAGC	AGTGCTGAAG	AGTAGGTCAG	AAAAAGCCTA	13020	
CCAGAAGCAA	GTGAGCCATA	GCAGCCCAGG	ATTGGGGTGA	CCTCCAGGGA	CAGGGCTGTT	13080	
GTTGTTGGAG	TTTTGTCTTT	GGTTTGGTTT	TTGTCTTTTG	AGACAGTTCT	GCTCTGTAGT	13140	
CCATGCCAGC	TTGAAACTAG	CAATGCTTCT	GCCTCAGCCT	CTCATTTGGAT	TGCAGGTGCA	13200	
ATCCACCTTC	CCGGCCCTAGG	TGTGGCTGTC	<u>GAATTCTCTC</u>	TGGCAGTCTG	CAAAAAGCGT	13260	EcoRI
TCCTAGTGTG	GTGTACAGGA	AGACGAGACC	AAAACAATTA	AAAAGGTGAC	AGAGACTGCA	13320	
TGTCAAATGA	AGAAGGGTGT	GGTGCCCAAG	CTGCAGGAAG	CTGGGGTTAG	AGAGGAGGGA	13380	
CAGGGTGACT	GACATCCTCA	GAGCAGGTCT	GAAGGCAGAC	ATTGGGGGAA	GCTGCTCAGT	13440	
TATGGTTCCG	TGGCACTGTA	AGAAAACAAG	CACAGTGCAC	AGGGGCGTAA	AGGGAAGGCA	13500	

Anhang 3: Sequenzvergleich des 3'Abschnitts des Cyclin E1-Gen der Maus

Der für diese Arbeit sequenzierte 3'Abschnitt des murinen Cyclin E1-Gens (obere Sequenz) wird der später veröffentlichten Sequenz aus NCBI ACCESSION: NT 081350 (untere Sequenz) gegenüber gestellt. Es wurde eine Übereinstimmung von 97,6% ermittelt. In blau ist die Sequenzinformation dargestellt, die von Dr. P. Jansen-Dürr zur Verfügung gestellt wurde.

```

ATTTTCAGCCT CGGAAAATCA GACCACCCAG AGCCTCCCCA CTTCCCGTCT TGAAGTAGGT 4857
ATTTTCAGCCT CGGAAAATCA GACCACCCAG AGCCTCCCCA CTTCCCGTCT TGAAGTAGGT 4857

GTTGACTTTG ACCCATGGCT TCTCAGTGTC ATTGGTCTTT CTGGTCTACA TTACTGTGGG 4917
GTTGACTTTG ACCCATGGCT TCTCAGTGTC ATTGGTCTTT CTGGTCTACA TTACTGTGGG 4917

TGCAGACTGA CATCTATCTA TCTGAGTTTT TCATGTTTCT TGTTCCTTCT TTTTACAGTT 4977
TGCAGACTGA CATCTATCTA TCTGAGTTTT TCATGTTTCT TGTTCCTTCT TTTTACAGTT 4977

GGGGCAATAG AGAAGAGGTT TGGAGGATCA TGTAAACAA AGAAAAGACT TACCTGAGAG 5037
GGGGCAATAG AGAAGAGGTT TGGAGGATCA TGTAAACAA AGAAAAGACT TACCTGAGAG 5037

ATGAGCACTT TCTGCAGCGT CATCCTCTCC TGCAGGCGAG GATGAGAGCA GTTCTTCTGG 5107
ATGAGCACTT TCTGCAGCGT CATCCTCTCC TGCAGGCGAG GATGAGAGCA GTTCTTCTGG 5107

ATTGGCTAAT GGAGGTGAGC TTGGAGGTTT CGGCTGCTGG GGCATCACCA CTGTTACCTT 5167
ATTGGCTAAT GGAGGTGAGC TTGGAGGTTT CGGCTGCTGG GGCATCACCA CTGTTACCTT 5167

TCTCTGTGCT GCTGCAGTCT CTGTGTGCTC TCTAACTGT TGAAGTTTCT GAAATAATCT 5227
TCTCTGTGCT GCTGCAGTCT CTGTGTGCTC TCTAACTGT TGAAGTTTCT GAAATAATCT 5227

TGTCCCTTAG ACATATTAAA GTTGGCATT TATTGTTTTT CCTATCTAAG TGTGAACAGT 5287
TGTCCCTTAG ACATATTAAA GTTGGCATT TATTGTTTTT CCTATCTAAG TGTGAACAGT 5287

TACAAAGTTT GTTTTTCTAA TAAGTTATTA ATTACAAATT AATGTCTACA TATATTTATA 5347
TACAAAGTTT GTTTTTCTAA TAAGTTATTA ATTACAAATT AATGTCTACA TATATTTATA 5347

TATGCTAAAT TGTTTTTAAAG ATGTCTACTG GAGGGCTGGA GAGATGGCTC AGCAGTTAAG 5407
TATGCTAAAT TGTTTTTAAAG ATGTCTACTG GAGGGCTGGA GAGATGGCTC AGCAGTTAAG 5407

AGTACTGGCT GCTCTTCCAG AGGTCCTGAG TTCAAATCCC AGCAACCACA TGGTGGCTCA 5467
AGTACTGGCT GCTCTTCCAG AGGTCCTGAG TTCAAATCCC AGCAACCACA TGGTGGCTCA 5467

CAACCATCCA TAATGAGATC TGATGCCATC TTCTGGTGTC TGAAGACAGC TACAGTGATC 5527
CAACCATCCA TAATGAGATC TGATGCCATC TTCTGGTGTC TGAAGACAGC TACAGTGATC 5527

TTACATATAA TAATAAATCT TAAAAAAGAG AGCTGTCTAC TGGAATGCAC ATACTAGCTG 5587
TTACATATAA TAATAAATCT TAAAAAAGAG AGCTGTCTAC TGGAATGCAC ATACTAGCTG 5587

```

TGCAGCGGTC ACTATCATTA ATTATAGGCA TATATGAACA GGTATGTGC AGCAGTCAGA 5647
 TGCAGCGGTC ACTATCATTA ATTATAGGCA TATATGAACA GGTATGTGC AGCAGTCAGA 5647

 TCTCAGATGT GCTTATTTGA ATTCCCGGGA TCCATTCTTT ACCCCCAGA AGTATTCTT 5707
 TCTCAGATGT GCTTATTTGA ATTCCCGGGA TCCATTCTTT CCCCCAAGA AGGATTCTT 5707

 AATAGACTGT CTTGTTCTAA TC_CATTGGG AATCCTCTTC CCTAGTTCTG TGCAGTGGTT 5767
 AATAGACTGT CTTGTTCTAA TCACATTGGG AATCTACTTC CCTAGTTCTG TGCAGTGGTT 5768

 AATCAATGAG CAAGCACATG AGGCTGGAGT AGTCTGCCTG CATAGTCTAG GCCTGTGGCT 5827
 AATCAATGAG CAAGCACATG AGGCTGGAGT AGTCTGCCTG CATAGTCTAG GCCTGTGGCT 5828

 CCATTCCAGA CAAGCTCAAA CAAATAAAAG AACCTCCAT ATTGCAGATT TTTTAAAGTA 5887
 CCATTCCAGA CAAGCTCAAA CAAATAAAAG AACCTCCAT ATTGCAGATT TTTTAAAGTA 5888

 TGACAGACTA ACTAGCTAAT CACTTAAACT TTTTAAATG AAATTTCAAG GCTGGGCCCA 5948
 TGACAGATTA ACTAGCTAAT CAC_TAAACT TTTTAAATG AAATTTCAAG GCTGGGCCCA 5948

 GCTGTGAGTA GTCTGATGGT CTAGCATGCA TGACACCCTA GGTTTAATCC TCAGTAGTAC 6008
 GCTGTGAGTA GTCTGATGGT CTAGCATGCA TGACACCCTA GGTTTAATCC TCAGTAGTAC 6008

 CAAAAGAAAG TGAAATTTGA TGAGTGGTGC ACCTCTTGCT GGGGGTAAAC GTTGAGTGAC 6068
 CAAAAGAAAG TGAAATTTGA TGAGTGGTGC ACCTCTTGCT GGGGGTAAAC GTTGAGTGAC 6068

 TTGTAGTGCT TGATTCAAG GGAACCTCCG GGGTACTTAT AGTGAGGAAG AAATGGCATT 6128
 TTGTAGTGCT TGGATTCAAG GGAACCTCCG GGGTACTTAT AGTGAGGAAG AAATGGCATT 6128

 TTCTGCTGAG AAGTGGAAGA ATCATGTTGG CAGGTTTACC TGTATCCCTA CTTTATATGA 6188
 TTCTGCTGAG AAGTGGAAGA ATCATGTTGG CAGGTTTACC TGTATCCCTA CTTTATATGA 6188

 TATGCAGCCT GTTGGGACCG AACCTAGAAT CATGCTCTGC ATTCTCTGCT GACTTGTCGC 6248
 TATGCAGCCT GTTGGGACCG AACCTAGAAT CATGCTCTGC ATTCTCTGCT GACTTGTCGC 6248

 TTCAGGGGCC TGGCTCAGAC AAATTGCTTA CATTTTGAGT CTGTTTATT TTAGATAGGC 6288
 TTCAGGGGCC TGGCTCAGAC AAATTGCTTA CATTTTGAGT CTGTTTATT TTAGATAGGC 6288

 TCTCATGTAG CCCAGGCTGA CCTTGAACCT GCTATGTAGT TAGAGGTAAT ATTAACTTC 6348
 TCTCATGTAG CCCAGGCTGA CCTTGAACCT GCTATGTAGT TAGAGGTAAT ATTAACTTC 6348

 TACCTCCTCC TCCCAAGTAG TGGGATTATA AATATATACC ACCACAAGTG GGTCTCTCTT 6408
 TACCTCCTCC TCCCAAGTAG TGGGATTATA AATATATACC ACCACAAGTG GGTCTCTCTT 6408

 TTCTTTTTTAA AAAAAAGAT TTATATGTAT GTCTGTGTGC CACTGTGTTT ATATACTCAC 6469
 TTCTTTTTTAA AAAAA_GAT TTATATGTAT GTCTGTGTGC CACTGTGTTT ATATACTCAC 6468

 AGAGGTCCCA AGAGGACGTC ATCTAGAATT ACAGGCAGCT GTGAGCCCAT CTGTGTGTGC 6529
 AGAGGTCCCA AGAGGACGTC ATCTAGAATT ACAGGCAGCT GTGAGCCCAT CTGTGTGTGC 6528

TGGGAACCGA	ACTCAGGTCC	TAGATGAGCA	GCACGTGCCC	ACTGAGCTGT	TTGTCCAGCT	6590
TGGGAACCGA	ACTCAGGTCC	TAGA_GAGCA	GCACGTGCCC	ACTGAGCTGT	TTGTCCAGCT	6588
CCAGTCTGCT	TGCTAGTCTC	TAGCATCTAC	AGGAAGTAGG	TTGCAGAGTT	GTACAGATTA	6650
CCAGTCTGCT	TGCTTGTCTC	TAGCATCTAC	AGGAAGTAGG	TTGCAGAGTT	GTACAGATTA	6648
GACATACTGT	ATAAGCCAGG	TGTTATGGCA	CAGCCTGTTG	ACTACATCCT	CACTACTGCA	6710
GACATACTGT	ATAAGCCAGG	TGTTATGGCA	CAGCCTGTTG	ACTACATCCT	CACTACTGCA	6708
GAAAGAAAGA	AAAGCTGCTG	ACAGTGCTGG	TGGACACTCG	AGGAGGCAGA	GGCAGGTGGA	6770
GAAAGAAAGA	AAAGCTGCTG	ACAGTGCTGG	TGGACACTCG	AGGAGGCAGA	GGCAGGTGGA	6768
GCTCTGAGGT	CAAGGCCAGC	CTGGGCTACA	GAACAAGTTC	CATTTCTCGC	CAGGGCTACA	6830
GCTCTGAGGT	CAAGGCCAGC	CTGGGCTACA	GAACAAGTTC	CATTTCTCGC	CAGGGCTACA	5828
CAGTGAGACC	CTATTTCAAA	AAGAAAATGT	AACTGGTATT	G TTCAGCAGT	GAAGACTATA	6890
CAGTGAGACC	CTATTTCAAA	AAGAAAATGT	AACTGGTATT	G TTCAGCAGT	GAAGACTATA	6888
CCAGTTCTTT	TTCTGAGTCA	CGGTGAAACC	TGTGAAGGGG	GTTGCATTCT	TAGAACTGTA	6950
CCAGTTCTTT	TTCTGAGTCA	CGGTGAAACC	TGTGAAGGGG	GTTGCATTCT	TAGAACTGTA	6948
GACTTTGTGG	AGTGGTCTCT	ATAAAAGTGC	T_CTTTGGTC	AGACCTAGCC	TGGCTGATTT	7010
GACTTTGTGG	AGTGGTCTCT	ATAAAAGTGC	TACTTTGGTC	AGACCTAGCC	TGGCTGATTT	7009
GCTCTTGCTG	TTTGTGTAAG	TCATAGTGCG	CTCAGTTCCT	GGGTCTCACT	GGGCTGTGCT	7070
GCTCTTGCTG	TTTGTGTAAG	TCATAGTGTG	CTCAGTTCCT	GGGTCTCACT	GGGCTGTGCT	7069
TAGGAGGAGT	AGGGTGACAG	CCTTGCATAA	AAGCAGTTAG	CTTTCTTACT	GTGTCAAAAAG	7130
TAGGAGGAGT	AGGGTGACAG	CCTTGCATAA	AAGCAGTTAG	CTTTCTTACT	GTGTCAAAAAG	7129
TCAGGCAAGT	TCGCTTGTGC	TGCCCCTCAG	GAGCCTTTTC	TAACATGGAA	TCCTTTTCCC	7190
TCAGGCAAGT	TCGCTTGTGC	TGCCCCTCAG	GAGCCTTTTC	TAACATGGAA	TCCTTTTCCC	7189
AGGTGTGCGA	AGTCTATAAG	CTCCACAGAG	AGACGTTCTA	CTTGGCACAG	GACTTCTTTG	7250
AGGTGTGCGA	AGTCTATAAG	CTCCACAGAG	AGACGTTCTA	CTTGGCACAG	GACTTCTTTG	7249
ATCGTTACAT	GGCATCACAA	CATAATATCA	TAAAAACACT	TTTACAGCTT	ATTGGGATTT	7310
ATCGTTACAT	GGCATCACAA	CAGAATATCA	TAAAAACACT	TTTACAGCTT	ATTGGGATTT	7309
CAGCCTTATT	TATTGCTTCA	AACTTGAGG	TAAAAAAAAC	CAAAAACAAC	AACAA_AA_A	7368
CAGCCTTATT	TATTGCTTCA	AACTTGAGG	TAAAAAAAAC	CAAAAACAAC	AACAACAACA	7369
A_CCTCCCTA	ACATTCTTTG	TGTGATAAGC	ATTATTTCTT	AAATTCTGCC	CCTATGAACA	7427
AACCTCCCTA	ACATTCTTTG	TGTGATAAGC	ATTATTTCTT	AAATTCTGCC	CCTATGAACA	7429

ACTGTCATAT	GCACCTTGAA	TTCTCTTAAC	TCTGACGCTT	TCTAAGTTAA	GGTAGACAGT	7487
ACTGTCATAT	GCACCTTGAA	TTCTCTTAAC	TCTGACGC_T	CTAAAGTTAA	GGTAGACAGT	7488
GTCAGGTGGA	GGCGGGTAAG	GAACAAGGCC	ATAGATCATT	TAGTTTAG_A	GCTACTT_AA	7545
GTCAGGTGGA	GGCGGGTAAG	GAACAAGGCC	ATAGATCATT	TAGTTTAGTA	GCTACTTTAA	7548
CCATAATTGA	CCT_GGAAC_	GAAGAGATTG	AAATTGTGGC	ATAGTGGTTT	CCCACTTGGG	7603
CCATAATTGA	CCTTGGGACT	GAAGAGATTG	AAATTG_GGC	ATAGTGGTTT	CCCACTTGGG	7607
ATCCTAACAC	TTAG_CAGCT	AAGGTAGAAT	GGGCAGTTTG	AGGCCTGCAT	GCCCTCAAAA	7662
ATCCTAACAC	TTAGACAGCT	AAGGTAGAAT	GGGCAGTTTG	AGGCCTGCAT	GCCCTCAAAA	7667
TAATATAAAA	AGGGTTGTCG	TGGGGTTCTT	TATAGACTAT	AGGGTGAATG	AAGAAGTCTA	7722
TAATATAAAA	AGGGTTGTCG	TGGGGTTCTT	TATAGACTAT	AGGGTGAATG	AAGAAGTCTA	7727
AGCAGTTTAT	CCATGAGTCT	TTTTGAGACA	GAATCTCTGT	AGCTCTAGCT	TGCTTAGATC	7782
AGCAGTTTAT	CCATGAGTCT	TTTTGAGACA	GAATCTCTGT	AGCTCTAGCT	TGCTTGATC	7787
CAGCAGCCTC	TGGAGTTGTG	ACATTAAAGG	CCACCACAGC	CAGCTAGCTT	TACTTCTTAT	7842
CAGCAGCCTC	TGGAGTTGTG	ACATTAAAGG	CCACCACAGC	CAGCTAGCTT	TACTTCTTAT	7847
A ^{ACTAGCATG}	CTTTCAGTTG	CTGAAGTGAA	CCAGTGTTGA	GCCATTGATT	GTATCCTCTT	7902
AGCTAGCATG	CTTTCAGTTG	CTGAAGTGAA	CCAGTGTTGA	GCCATTGATT	GTATCCTCTT	7907
TCCACGTCAG	CATACTAGAG	CCATTTTGGA	TGCATGTCCT	AATCTGAAAG	TGCTAGGAAC	7962
TCCACGTCAG	CATACTAGAG	CCATTTTGGA	TGCATGTCCT	AATCTGAAAG	TGCTAGGAAC	7967
GGTTTCTTCT	AATAGCATCT	TCCTTCTGTT	CCCTTTTAGG	AAATCTACCC	TCCAAAGT_G	8021
GGTTTCTTCT	AATAGCATCT	TCCTTCTGTT	CCCTTTTAGG	AAATCTACCC	TCCAAAGTTG	8027
CACCAGTTTG	CTTATGTTAC	AGATGGCGCT	TGCTCCGGGG	ATGAAATTCT	TACCATGGAA	8081
CACCAGTTTG	CTTATGTTAC	AGATGGCGCT	TGCTCCGGGG	ATGAAATTCT	TACCATGGAA	8087
TTGATGATGA	TGAAGGCAGG	TTACACATTA	ATATCGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGAC	8141
TTGATGATGA	TGAAGGCAGG	TTACACATTA	ATATCGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	8147
AG_____A_	GAGACAGAG	AGAGAGACTG	TCTTTCCCTT	GCAAGGTGTG	GTGTGCCCAC	8193
TGTGTGTGAC	AGAGAGACAG	AGAGAGACTG	TCTTTCCCTT	GCAAGGTGTG	GTGTGCCCAC	8207
CACCACCGTG	GGTCTTATCC	AGTTAGCCAT	GTGGCAGGGA	CTATGGCTGA	GCTTTTCACA	8253
CACCACCGTG	GGTCTTATCC	AGTTAGCCAT	GTGGCAGGGA	CTATGGCTGA	GCTTTTCACA	8267
ACTGTCACTT	CTTTCCTTTA	GGCCCTTAAG	TGGCGTCTAA	GCCCTCTGAC	CATTGTGTCC	8313
ACTGTCACTT	CTTTCCTTTA	GGCCCTTAAG	TGGCGTCTAA	GCCCTCTGAC	CATTGTGTCC	8317
TGGCTGAATG	TCTATGTCCA	AGTGGCCTAT	GTCAACGACA	CGGGTGAGGT	GCTGATGCCT	8373
TGGCTGAATG	TCTATGTCCA	AGTGGCCTAT	GTCAACGACA	CGGGTGAGGT	GCTGATGCCT	8377

CAGTACCCAC	AGCAGGTCTT	CGTGCAGATC	GCAGAGGTAT	GTGGACCTTC	TGCTTGCCCA	8433
CAGTACCCAC	AGCAGGTCTT	CGTGCAGATC	GCAGAGGTAT	GTGGACCTTC	TGCTTGCCCA	8437
CTGTGTGTTT	GTG <u>GGCACA</u>	CCACAGCTCA	GGGGCTTCTA	GAAGCTTCAT	GTGGCATCTT	8492
CTGTGTGTTT	GTGTGGCACA	CCACAGCTCA	GGGGCTTCTA	GAAGCTTCAT	GTGGCATCTT	8497
GTCTTAGTGC	TCCTGTCTTC	CTTAGCTTCT	AGACCTGTGC	GTCCTGGATG	TTGGCTGCTT	8552
GTCTTAGTGC	TCCTGTCTTC	CTTAGCTTCT	AGACCTGTGC	GTCCTGGATG	TTGGCTGCTT	8557
AGAATTTCCCT	TATGGTGTCC	TCGCTGCTTC	TGCTTTGTAT	CATTTCTCCT	CACTGGAGTT	8612
AGAATTTCCCT	TATGGTGTCC	TCGCTGCTTC	TGCTTTGTAT	CATTTCTCCT	CACTGGAGTT	8617
GATGCAGAAG	GTCTCAGGTA	TGTTGGGCTT	TCCTGTGAGT	TCACAGACAA	GGTGTCTTCA	8672
GATGCAGAAG	GTCTCAGGTA	TGTTGGGCTT	TCCTGTGAGT	TCACAGACAA	GGTGTCTTCA	8677
AGGTACAAGC	CAGCTATCAG	CTGCGGACTG	AGCCTCTGAC	TTCTTTACTG	GCAGGTTATC	8732
AGGTACAAGC	CAGCTATCAG	CTGCGGACTG	AGCCTCTGAC	TTCTTTACTG	GCAGGTTATC	8737
AGTGGTGCGA	CATAGAGAAG	TGTGTCAAAT	<u>GAATGGTTCC</u>	GTTCGCCATG	GTTATCCGGG	8792
AGTGGTGCGA	CATAGAGAAG	TGTGTCAAAT	GGATGGTTCC	GTTCGCCATG	GTTATCCGGG	8797
AGATGGGAAG	TTCCAAGCTC	AAGCACTTCC	GGGGAGTCCC	CATGGAAGAC	TCCCACAACA	8852
AGATGGGAAG	TTCCAAGCTC	AAGCACTTCC	GGGGAGTCCC	CATGGAAGAC	TCCCACAACA	8857
TCCAGACCCA	CACCAACAGC	TTGGATTTGC	<u>TCCAACAGCT</u>	<u>TGGATTTGCT</u>	GGTCAG <u>AAT</u>	8911
TCCAGACCCA	CACCAACAGC	TTGGATTTGC	<u>T</u>		GGTCAGTAAT	8898
CTCCTTGCTC	CCTCCCATCA	GACAAGTACT	TAACCAACTC	TGCCTAAGGA	AAAGCCAGTT	8977
CTCCTTGCTC	CCTCCCATCA	GACAAGTACT	TAACCAACTC	TGCCTAAGGA	AAAGCCAGTT	8964
CTAACTCCAT	TAAGAATGTT	TCTAGTCCAT	AGAGTCTGTG	TCTCAGTATG	CGAATACTAT	9037
CTAACTCCAT	TAAGAATGTT	TCTAGTCCAT	AGAGTCTGTG	TCTCAGTATG	CGAATACTAT	9024
AGACATTAGG	TGAGA <u>GGGG</u>	TTGTTTACTG	AGACCAGTTC	TTACTAGATA	TAGCCCAGGC	9097
AGACATTAGG	TGAGAGGGGG	TTGTTTACTG	AGACCAGTTC	TTACTAGATA	TAGCCCAGGC	9084
TGACCTTGAA	CTCAGAAGTC	TGACCTCTCC	CCTCAAGTGG	TAGGATTTGC	CACCAAGCCT	9157
TGACCTTGAA	CTCAGAAGTC	TGAC <u>TC</u> <u>CC</u>	<u>C</u> <u>TCAAGTGG</u>	TAGGATTTGC	CACCAAGCCT	9141
AACTATAATT	TTTGCTATTT	CTCCCTCTTG	CCTCCATATT	AAAAACATAC	AGCAAGAAAA	9217
AACTATAATT	TTTGCTATTT	CTCCCTCTTG	CCTCCATATT	AAAAACATAC	AGCAAGAAAA	9201
ACGACACTTT	GTTTAACTTT	GACAACTTTC	CCTCTTATTC	TTATG <u>AGGA</u>	CAAAGCCCAA	9266
ACGACACTTT	GTTTAACTTT	GACAACTTTC	CCTCTTATTC	TTATGTAGGA	CAAAGCCCAA	9261
GCAAAGAAAG	CCATATTGTC	AGAACAGAAT	AGGATTTCTC	CTCCTCCGAG	TGTGGTCCTG	9326

GCAAAGAAAG CCATATTGTC AGAACAGAAT AGGATTTCTC CTCCTCCGAG TGTGGTCCTG 9321

ACACCCCCAC CCAGCAGTAA GAAGCAGAGC AGCGAGCAGG AGACAGAATG ACCAAACCTG 9386

ACACCCCCAC CCAGCAGTAA GAAGCAGAGC AGCGAGCAGG AGACAGAATG ACCAAACCTG 9381

CCATTGCCTC CAAAGACAGT GGTGTGGAAG CAGCTGCCTG GAGCTCCCTG TGCTGCCTTG 9446

CCATTGCCTC CAAAGACAGT GGTGTGGAAG CAGCTGCCTG GAGCTCCCTG TGCTGCCTTG 9441

GAGGTCAGGA GCCCCTGCAG ATGCTGTGCT CTATGGAGAG GTGCATCTCT TCAGGAGCAG 9506

GAGGTCAGGA GCCCCTGCAG ATGCTGTGCT CTATGGAGAG GTGCATCTCT TCCGGAGCAG 9501

CAGGGGTCTG CAAGATGCCT TGGATGGAAG TGCTTTTATT GAATGCTAGG TGTTTAACT 9566

CAGGGGTCTG CAAGATGCCT TGGATGGAAG TGCTTTTATT GAATGCTAGG TGTTTAACT 9561

ATAGGGTCAA GTACACCAGC CACCTCCAGA ACACCACTGA GTGCTCCAGA AGCTGCTAAG 9626

ATAGGGTCAA GTACACCAGC CACCTCCAGA ACACCACTGA GTGCTCCAGA AGCTGCTAAG 9621

GAGGGTGCTA CTTGACCCAC TGGACTCTTC ACACAGATGA CACAAGCTTG AAGTTAAGGA 9686

GAGGGTGCTA CTTGACCCAC TGGACTCTTC ACACAGATGA CACAAGCTTG AAGTTAAGGA 9681

GGCCACGCCA TGGCGGTTGC TGGCCTCTGC TCGGGTGTTG TAGGTTGCTG TTGATAGGCT 9746

GGCCACGCCA TGGCGGTTGC TGGCCTCTGC TCGGGTGTTG TAGGTTGCTG TTGATAGGCT 9741

GTGACCAGTG GTTGTGAGCA ATGTGTTGGAT GCAGAGCCCA CAGCCTGGCC TAGGCTGCCC 9806

GTGACCAGTG GTTGTGAGCA AGTGTGTTGGAT GCAGAGCCCA CAGCCTGGCC TAGGCTGCCC 9801

TTCTCCACTG TCAGCCAACA GCATGTCCTG CCTTCATGAA CTCTTATTTT GTAAGTGCT 9866

TTCTCCACTG TCAGCCAACA GCATGTCCTG CCTTCATGAA CTCTTATTTT GTAAG_TGCT 9860

GCTATGTCTA TCAATTTTTA ATAAAGATAA TACTATCTTT G 9907

GCTATGTCTA TCAATTTTTA ATAAAGATAA TACTATCTTT G 9901

Lebenslauf

Name: Nils-Holger Zschemisch
Anschrift: Schierstr. 5, 31558 Hagenburg
Geburtstag: 26.08.1969
Geburtsort: Stadthagen, Landkreis Schaumburg
Eltern: Peter Zschemisch und Ingeborg Zschemisch, geb. Kiel
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1976 bis 1980 Grundschule Hagenburg
1980 bis 1982 Orientierungsstufe Steinhude
1982 bis 1989 Hölty Gymnasium Wunstorf
1989 Abitur

Wehrdienst: Juni 1989 bis August 1990 Grundwehrdienst in Nienburg/Weser

Studium: WS 1990/91
bis SS 1993 Studium der Diplom-Biologie an
der Phillips-Universität Marburg
bis SS 1998 Fortsetzung des Biologie-Studiums an der
Universität Hannover
WS 1997/98 Diplom-Hauptprüfung mit dem Hauptfach Zoologie
bis SS 1998 Diplomarbeit mit dem Thema: " Untersuchungen zur
Verwendbarkeit der Haut des Schweineohres in der
dermatologischen Forschung" bei Prof. Dr. W. Meyer,
Anatomisches Institut der Tierärztlichen Hochschule
Hannover

Beruflicher Werdegang:

August 1998 Aufnahme in das Graduiertenkolleg "Molekulare Pathologie des Zellwachstums" mit dem Projekt "Die Rolle von Tumorsuppressorgendefekten in der Hepatokarzinogenese: Expressions- und LOH-Analysen" unter Anleitung von Prof. Dr. D. Paul in der Abteilung Zellbiologie des Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover

April 2000 Seit dem 01.04.2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover

September 2001 Fortbildungskurs "Gentechnische Sicherheit"

Liste wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Meyer, W. und N.-H. Zschemisch, 1999: Remarks on the usefulness of toluidine blue staining for RNA cytophotometry in plastic embedded tissues, *Cell Mol Biol*, 45: 379-382.

Meyer, W. und N.-H. Zschemisch, 1999: Untersuchungen zur mikroskopischen Anatomie der Ohrhaut des Wildschweins (*Sus scrofa* L.) , *Z Jagdwissenschaft*, 45: 107-126.

Meyer, W., N.-H. Zschemisch und K. Neurand, 2001: Investigations in the structure of the ear skin in the domesticated pig, with special reference to the use for human dermatological research: 1. Macroscopical aspects and hair coat, *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 114: 92-99.

Meyer, W., N.-H. Zschemisch und K. Neurand, 2001: Investigations in the structure of the ear skin in the domesticated pig, with special reference to the use for human dermatological research: 2. Specific histology of the integument, *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 114: 100-111.

Meyer, W. und N.-H. Zschemisch, 2002: Skin layer thickness at the ear of the domesticated pig, with special reference to the use of the porcine ear integument for human dermatological research, *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 115: 401-406.

Meyer, W., N.-H. Zschemisch und S. Godynicki, 2003: The porcine ear skin as a model for the human integument: Influence of storage conditions on basic features of epidermis and function – a histological and histochemical study, *Pol J Vet Sci*, 6: 17-28.

N.-H. Zschemisch, C. Liedtke, T. Wüstefeld, R. Halter, J. Borlak, M. P. Manns und C. Trautwein, 2003: Expression of a short cyclin E1 splice variant inversely correlates with cell cycle progression in hepatocytes, *Hepatology*, 38 (Suppl. 1): 581A.

Liedtke, C., Zschemisch, N.-H., Cohrs, A., Halter, R., Borlak, J., Manns, M. P. und C. Trautwein, 2003: Lack of Caspase-8 expression in murine hepatocellular carcinomas is associated with hypermethylation at SP1 binding sites in the murine Caspase-8 promotor, *Hepatology*, 38 (Suppl.1): 242A-243A.

Zschemisch, N.- H., Liedtke, C., Halter, R., Borlak, J., Manns, M. P. und C. Trautwein, 2003: Isolation and identification of Cyclin E1 isoforms in murine hepatocellular carcinomas, *J Hepatol*, 38 (Suppl. 2): 107-108.

Liedtke, C., Zschemisch, N.-H., Cohrs, A., Borlak, J., Manns, M. P. und C. Trautwein, 2004: Silencing of Caspase-8 in murine hepatocellular carcinomas is correlated with CpG methylation of an essential Caspase-8 promotor element, *J Hepatol*, 40 (Suppl. 1): 88.

N.-H. Zschemisch, C. Liedtke, T. Wüstefeld, M. P. Manns und C. Trautwein, 2004:
Overexpression of Cyclin E1 variant Delta 3/8 delays cell cycle reentry, J Hepatol, 40
(Suppl. 1): 89-90.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Alle benutzten Hilfsmittel und zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Hannover, im Juni 2004

Danksagung

Der Weg bis zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit war gleichermaßen von Höhen wie von Tiefen bestimmt. Besonders bin ich meiner Mutter zu Dank verpflichtet, die mich in dieser langen Zeit immer unterstützt hat. Ihren Aufmunterungen und Ihr Optimismus haben mich angespornt.

Die gute wissenschaftliche Ausbildung, die ich durch meine Lehrer Dr. Dietmar Hain, Dr. Reiner Klocke und im Besonderen durch Prof. Dr. Wilfried Meyer erfahren habe, hat mich geprägt und findet nun ihren Niederschlag in dieser Arbeit.

Prof. Dr. Christian Trautwein und Prof. Dr. Michael P. Manns danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Christian Liedtke. Mit stetigem Ansporn und freundschaftlicher Kritik hat Dr. Liedtke meine wissenschaftliche Arbeit begleitet und gefördert. Er war mir ein Vorbild an Disziplin, Wissensdrang und Integrität und ist mir ein guter Freund.